UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

RECHERCHES

SUR LES

ACTIVITÉS HYDROLYSANTES

ET

TRANSFÉRANTES DES α-GALACTOSIDASES

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU TITRE DE

Docteur de l'Université de Paris

(PHARMACIE)

Présentée et soutenue le *1962*

PAR

Fahrettin PETEK

JURY

MM. J.-E. COURTOIS, Président

P. MALANGEAU, Professeur

F. PERCHERON, Maître de Conférences

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

RECHERCHES

SUR LES

ACTIVITÉS HYDROLYSANTES

ET

TRANSFÉRANTES DES α-GALACTOSIDASES

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU TITRE DE

Docteur de l'Université de Paris

(PHARMACIE)

Présentée et soutenue le *1962*

PAR

Fahrettin PETEK

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

JURY

MM. J.-E. COURTOIS, Président
P. MALANGEAU, Professeur
F. PERCHERON, Maître de Conférences

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549205_0002

PERSONNEL DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

MM. G. VALETTE	Doyen
M.M. JANOT	Assesseur
L. RODINEAU	Secrétaire général
L. JEANDEL	Secrétaire général adjoint
Mme S. CERTAIN	Secrétaire
Mme M.L. ESPINASSE	Secrétaire
M. G. FROISSART	Secrétaire

DOYEN HONORAIRE

M. R. FABRE	Membre de l'Institut

PROFESSEURS HONORAIRES

MM.M. DELEPINE	Membre de l'Institut
L. LAUNOY	
P. FLEURY	
M. MASCRE	
M. PICON	
C. BEDEL	
R. FABRE	Membre de l'Institut

PROFESSEURS

MM.M.M. JANOT	Pharmacie galénique (T)
G. VALETTE	Pharmacodynamie (T)
R. PARIS	Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale (T)

MM. M. GUILLOT	Physique (T)
J. GAUTIER	Chimie organique (T)
Mle S. LAMBIN	Microbiologie (T)
MM. Y. RAOUL	Zoologie appliquée (T)
J.E. COURTOIS	Chimie biologique (T)
L. DOMANGE	Chimie minérale (T)
P. CRETE	Botanique (T)
R. TRUHAUT	Toxicologie et Hygiène industrielle (T)
A. MORETTE	Hydrologie (T)
R. CAVIER	Parasitologie (T)
A. QUEVAUVILLER	Hygiène et Education sanitaire
R. MOREAU	Pharmacie chimique (T)
J. GUY	Mathématiques appliquées aux sciences physiques et biologiques (T.P.)
A. GERMAN	Virologie et sérologie (T.P.)
M. PIETTE	Biologie sanguine (T.P.)
P. MALANGEAU	Chimie analytique (T)
M. GIRARD	Chimie appliquée à l'expertise (T)
G. DILLEMANN	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie (T)
G. DEYSSON	Professeur sans chaire
J. FLAHAUT	Professeur sans chaire
C. BOUDENNE	Professeur sans chaire
A. LE HIR	Professeur sans chaire
J. RENAULT	Professeur sans chaire

MAITRES DE CONFERENCES

MM.	Y. COHEN	Sciences naturelles
	P. LARUELLE	Physique
	G. LE MOAN	Toxicologie
	P. ROSSIGNOL	Pharmacodynamie
	H. RENAULT	Pharmacie chimique
	C. PAOLETTI	Sciences appliquées
	A. MANGEOT	Chimie analytique
	P. DELAVEAU	Matière médicale
	P. REYNAUD	Sciences physico-chimiques
	J. POISSON	Sciences naturelles
	A. DESVIGNES	Microbiologie
	F. PERCHERON	Biochimie
	J. SAVEL	Sciences naturelles
	J. BORY	Sciences naturelles

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM.	P. BINET	Parasitologie
	P. GESTEAU	Physique biologique
	J. GOUNELLE	Analyse appliquée au contrôle des médicaments (section biologie)
	J. HARISPE	Chimie générale et pharmaceutique
	J. HENRY	Chimie (4ème année)
Mme	J. HUBERT	Microbiologie
MM.	R. LELUC	Microbiologie
	M. LEMONNIER	Chimie analytique (2ème et 3ème années)
Mlle	S. LONGUEVALLE	Service des examens de Chimie

MM. F. PELLERIN	Chimie analytique (2ème et 3ème années)
R. PERLES (F.Fonc.)	Chimie biologique
J. PESTIS (F.Fonc.)	Biologie animale
R. POULLAIN	Hématologie
J. RIVET (F.Fonc.)	Physique
Mme M. ROBERT	Sérologie
Mlles A. ROLLEN	Biologie végétale
L. SEGUIN (F.Fonc.)	Analyse appliquée au contrôle des Médicaments (Section physico-chimie)
Mme M. SEILLER (F.Fonc.)	Pharmacie galénique industrielle
M. J. YONGER (F.Fonc.)	Chimie analytique (1ère année)

INSTITUT DE PHARMACOTECHNIE ET DE PHARMACODYNAMIE

M. A. CAVE	Chef de travaux de pharmacotechnie galénique
Mlle H. MORIN	Chef de travaux de pharmacodynamie

BIBLIOTHEQUE

Mlle Y. RUYSSEN	Conservateur, chargée de la Direction
Mlle S. LAVAUD	Conservateur
Mmes A. DESGRIPPES	Bibliothécaire
G. KREHMER	Bibliothécaire

-o-o-o-

A Monsieur le Professeur J.E. COURTOIS

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris,

Pharmacien des Hôpitaux de Paris,

Chevalier de la Légion d'Honneur,

Qui nous a fait l'honneur de nous associer
à quelques uns de ses travaux, de diriger
nos recherches, et de présider notre jury
de thèse.

En témoignage de notre profonde reconnaissance
et de notre respectueux attachement.

A Monsieur le Professeur P. FLEURY

Professeur honoraire à la Faculté de Pharmacie de Paris,

Pharmacien honoraire des Hôpitaux Psychiâtriques de la Seine,

Membre de l'Académie Nationale de Médecine,

Officier de la Légion d'Honneur,

Qui nous a accueilli dans son Laboratoire avec la plus grande bienveillance et n'a cessé de nous prodiguer ses conseils éclairés.

Hommage de profond respect.

A Monsieur le Professeur P. MALANGEAU

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris,

Pharmacien-Chef des Hôpitaux Psychiâtriques de la Seine,

Qui nous a prodigué ses critiques avisées et nous a témoigné un intérêt constant tout au long de ce travail.

En témoignage de notre respectueuse gratitude.

A Monsieur le Professeur F. PERCHERON

Maître de Conférences à la Faculté de Pharmacie de Paris,

Qui a bien voulu accepter de juger ce travail,

Très respectueux hommage.

A la mémoire de mes parents,

A ma femme et à ma fille,

A mes amis,

RECHERCHES SUR LES ACTIVITÉS HYDROLYSANTES

ET TRANSFÉRANTES DES α-GALACTOSIDASES

-o-o-o-

I N T R O D U C T I O N

La découverte de l'α-galactosidase remonte à 1895 : BAU d'une part (8), FISCHER et LINDNER d'autre part (48), ont signalé l'existence, dans la levure de brasserie, d'un enzyme susceptible d'hydrolyser le mélibiose ou α-galactosido (1→ 6) glucose.

L'α-galactosidase est assez peu répandue dans la nature. Elle n'a suscité, de ce fait, qu'un petit nombre de recherches; alors que la β-galactosidase et les glucosidases α et β ont fait l'objet d'un grand nombre de travaux (26).

Nous nous sommes proposé d'étudier l'action, tant hydrolysante que transférante, de l'α-galactosidase. Nous avons employé le plus souvent l'α galactosidase des graines de Café qui constituent, d'après HELFERICH et VORSATZ (58), une des sources les plus riches. Nous avons pu constater que la préparation obtenue selon le protocole opératoire de ces auteurs a dédoublé tous les α-D-galactosides employés comme substrats : phényl-α-D-galactoside,mélibiose, raffinose, stachyose, manninotriose, acide manninotrionique, acide mélibionique. Cette préparation demeure sans action sur le méthyl-α-D-glucoside, le saccharose, l'acide maltobionique : elle est donc dépourvue d'α-glucosidase. Néanmoins, elle renferme de faibles quantités de β-glucosidase et de β-galactosidase : elle hydrolyse, en effet, très lentement, le méthyl-α-D-glucoside et le lactose.

Lorsque le corps soumis à l'action de l'enzyme du Café renferme plusieurs restes de galactose reliés en (1→ 6), c'est la molécule située à l'extrémité de la chaîne qui est détachée la première. Dans le cas du stachyose, nous

avons constaté que l'action de l'α-galactosidase s'effectue en deux étapes : l'enzyme met d'abord en liberté une première molécule de galactose à côté du raffinose que nous avons isolé et identifié : puis le raffinose est lui-même hydrolysé en galactose et saccharose.

Nous avons ensuite étudié l'action de l'enzyme du Café sur la galactomannane de Luzerne. Nous avons pu montrer que l'enzyme détache des molécules de galactose terminales, branchées sur des chaînes centrales où prédomineraient les unités mannose.

Les possibilités d'action de l'α-galactosidase ne sont pas limitées à l'hydrolyse des α-galactosides; l'enzyme est également susceptible de transférer le galactose sur des accepteurs présents dans le milieu réactionnel pour former de nouveaux α-galactosides. BOURQUELOT et coll. (I5) (62) (63) avaient réalisé la synthèse des osides en mettant à profit la réversibilité d'action des osidases : mais c'est à RABATÉ que l'on doit la mise en évidence en I935 de l'activité transférante des hydrolases. L'auteur a montré que l'enzyme des feuilles de Saule scindait les β-glucosides de phénols , entre autres le salicoside et le picéoside. En présence des composés hydroxylés, la fraction phénolique est mise en liberté, tandis qu'une partie du glucose se combine au dérivé alcoolique. Les hétérosides phénoliques et les alcools se comportent donc respectivement comme donateurs et comme accepteurs de glucose.

Pour notre part, en utilisant une préparation enzymatique des graines de Café, nous avons démontré que l'α-galactose du mélibiose peut être transféré sur le méthanol. Le méthyl-α-D-galactoside a pu être isolé et identifié.

Par la suite, en prenant le phényl-α-D-galactoside comme donateur, nous avons montré que l'enzyme est susceptible de transférer le galactose sur divers alcools, aldohexoses et disaccharides.

Avec le mannose accepteur, nous avons pu isoler le corps formé par transfert et l'identifier à l'épimélibiose ou α-galactosido-(1→ 6)-mannose.

Nous avons mis en évidence la formation par transfert du raffinose avec le phényl-α-D-galactoside donateur et le saccharose accepteur, en utilisant l'α-galactosidase du Café.

Dans le cas du cellobiose accepteur, nous avons obtenu un trisaccharide, le galactosido-cellobiose. Cependant, un certain nombre d'oses : pentoses, méthyl-pentoses, cétohexoses ne peuvent jouer le rôle d'accepteurs.

Notre travail a pour but d'étudier l'action, tant hydrolysante que transférante, de l'α-galactosidase. Il a été effectué au Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté de Pharmacie de Paris.

Avant d'exposer les résultats de ce travail, qu'il nous soit permis de témoigner notre profonde gratitude à notre Maître, Monsieur le Professeur J.E. COURTOIS qui a guidé nos premiers pas dans la recherche scientifique. Il a suivi jour après jour le développement de ce travail et ne nous a ménagé ni son appui ni ses conseils éclairés. Vers lui, va toute notre profonde et affectueuse reconnaissance.

Nous adressons à Monsieur le Professeur P. FLEURY nos plus vifs remerciements pour son accueil bienveillant au Laboratoire de Chimie Biologique. Il a toujours fait preuve d'une très grande indulgence à notre égard et nous a donné de judicieux conseils tout au long de nos recherches. Qu'il veuille bien accepter ici notre hommage tout particulier.

Monsieur le Professeur P. MALANGEAU nous a donné de multiples témoignages de sa sympathie pendant notre séjour au Laboratoire; nous le remercions d'avoir accepté de juger ce travail.

Nous exprimons également tous nos remerciements à Monsieur le

Professeur F. PERCHERON, qui a toujours porté intérêt à nos recherches et a bien voulu accepter de faire partie de notre jury.

Nous sommes heureux d'exprimer notre gratitude à Monsieur le Professeur A. DESJOBERT et à Monsieur C. ANAGNOSTOPOULOS, Maître de Recherches au C.N.R.S., qui nous ont fait profiter de leur expérience dans le domaine de la Recherche et ont toujours été des conseillers précieux et amicaux.

Il nous est agréable d'exprimer nos sincères remerciements à Madame A. DE GRANDCHAMP, Docteur ès Sciences, à Monsieur TO DONG, Chargé de Recherches au C.N.R.S. et à Monsieur P. LE DIZET, Ingénieur agricole, qui nous ont aidé dans la rédaction de cette thèse.

PREMIERE PARTIE

GENERALITES

-o-o-o-o-

CHAPITRE I

GENERALITES SUR LES α-GALACTOSIDASES

Les α-galactosidases sont des osidases susceptibles d'hydrolyser, de synthétiser, de former par transfert au niveau de la liaison osidique, des dérivés ayant la configuration stéréochimique caractéristique de l'α-galactopyranose (100).

Des recherches récentes sur ces enzymes ont fait l'objet de deux mises au point de VEIBEL, en 1941 (101) et en 1950 (102).

Les thèses de ARNAUD en 1958 (4) et de TO DONG en 1962 (100) ont apporté de nouvelles précisions sur ce sujet.

I. REPARTITION

La répartition des α-galactosidases est indiquée dans les tableaux I, II, III.

TABLEAU I : Répartition des α-galactosidases dans les plantes

Organismes	Références
Cryptogames	
Saccharomyces (levure basse de brasserie)	HÉRISSEY, AUBRY (62)
	WEIDENHAGEN (I08)
	WEIDENHAGEN, RENNER (I09)
Aspergillus niger	HOFMANN (69)
Aspergillus oryzae	WEIDENHAGEN, RENNER (I09)
	ARNAUD (4)
Saccharomyces (kéfir)	HELFERICH (57)
Aspergillus, Penicillium, Sterigmatocystis	COURTOIS, CARRÈRE, PETEK (29)
Phanérogames	
Amygdalus communis (amandes douces)	NEUBERG (84)
Medicago sativa (luzerne)	HILL (66), ARNAUD (4)
Coffea arabica (café)	HELFERICH, VORSATZ (58)
Hordeum vulgare (orge germé)	HELFERICH, DEMANT, GOERDELER,
	BOSSE (59)
Pinus thumbergii (pin)	HATORI, SHIROYA (56)
Populus tremula (peuplier)	PRIDHAM (9I)
Trigonella foenum graecum (fenugrec)	COURTOIS, PERCHERON (33)
Vicia sativa (vesce),	
Lactuca virosa (laitue),	
Sisymbrium nasturtium, Thumb. (cresson)	
Allium cepa (oignon)	PETEK, TO DONG (88)

TABLEAU II : Répartition des α-galactosidases dans les bactéries

Organismes	Références
Bacillus Delbrückii	HOFMANN (70)
Pseudomonas eisenbergii	HOFMANN (70)
Escherichia coli	HOECHNER (68)
Escherichia coli B	KOPPEL, PORTER, CROCKER (76)
	SHEININ, CROCKER (96)
Escherichia coli K12	LESTER, BONNER (79)
Aerobacter aerogenes	HOGNESS, BAILEY (71)
Bacillus circulans	CARRÈRE, LAMBIN, COURTOIS (20)

TABLEAU III : Répartition des α-galactosidases dans les animaux

Organismes	Références
Escargot Helix pomatia	BIERRY (11)
	NAGAOKA (82)
Huître	COURTOIS, PETEK, TO DONG (36)
Patelle Patella vulgata	CONCHIE, LEVVY (22)
Lapin (plasma séminal),	CONCHIE, MANN (23)
Cheval (secrétions vésiculaire, plasma séminal épididymal)	
Lapin, Chat sauvage, Chevreuil, Mouton, Boeuf, Cheval, Marcassin, Porc (rein)	DEBRIS, COURTOIS, PETEK (44)
Ver à soie Bombyx mori	KOIKE (75)
Mouche à viande Calliphora erythrocephala	EVANS (46)
Mouche Lucilia cuprina	WEBBER (106)
Punaise de bois Porcellio	NEWCOMER (86)
Coléoptère xylophage Ips typographus	COURTOIS, CHARARAS, DEBRIS (30
Hanneton Melolontha vulgaris	ZANOUZI (117)

2. SPECIFICITE ET PROPRIETES

Spécificité

Les α-galactosidases, comme la plupart des osidases, ont des spécificités liées directement au résidu " osyl ".

Elles ne peuvent hydrolyser, ni les β-D-galactosides, ni les α-D-thio-

galactosides. Par ailleurs, elles ne possèdent aucune activité sur les α-galactosides dont la partie glycone a subi un changement quelconque portant sur les carbones 2,3 ou 4.

Cependant, ces enzymes peuvent hydrolyser les β-L-arabinosides, les α-D-fucosides, les α-D-mannoheptosides.

Propriétés

Les α-galactosidases sont des enzymes plus labiles que les β-galactosidases. Les pH optima signalés par divers auteurs ont montré que ces osidases agissent toujours en milieu acide (Tableau IV). Les valeurs de la constante de MICHAËLIS obtenues pour les α-galactosidases d'origines variées sont très voisines, ce qui laisse supposer qu'il existe une certaine similitude dans la configuration des centres actifs (Tableau V). De nombreux oligosaccharides ont été formés par action transférante de ces enzymes (Tableau VI).

TABLEAU IV : pH optimum des α-galactosidases

Sources	pH optimum	Références
Café (préparation brute)	3 - 6	HELFERICH, VORSATZ (58)
Escargot	3,2 - 3,8	NAGAOKA (82)
Fenugrec	3,2 - 4,6	COURTOIS, PERCHERON (33)
Luzerne	3,3 - 5	HILL (66)
Penicillium paxillus	4,6	COURTOIS, CARRÈRE, PETEK (29)
Ips typographus	5	COURTOIS, CHARARAS, DEBRIS (30)
Orge germé	5	HELFERICH, DEMANT, GOERDELER, BOSSE (59)
Levure	5	WEIDENHAGEN (IO7)
Plantago major (racines)	5	TO DONG (IOO)
Rein de mammifères	5,2	DEBRIS, COURTOIS, PETEK (44)
Plantago major (feuilles)	5,3	TO DONG (IOO)
Plantago ovata (1er enzyme)	5,3	TO DONG (IOO)
Café (graines) (1er enzyme)	5,3	PETEK, TO DONG (88)
Plantago ovata (graines) (2ème enzyme)	5,9	TO DONG (IOO)
Café (graines) (2ème enzyme)	6	PETEK, TO DONG (88)
Huître	6	COURTOIS, PETEK, TO DONG (36)
Hanneton	6	COURTOIS, PETEK, ZANOUZI (37)(38)

TABLEAU V : Km des α-galactosidases

Sources	Substrats	pH de l'essai	10^3Km	Références
α-galactosidase brute de Café	mélibiose	4	6,6	COURTOIS, WICKSTROM, LE DIZET (42)
- id -	raffinose	-	3	-
- id -	plantéose	-	3	-
- id -	phényl-α-D-galactoside	5	0,8	ARNAUD (4)
taka-diastase	- id -	-	2,2	-
Luzerne	- id -	-	I,2	-
rein de Porc	- id -	4,8	10	DEBRIS, COURTOIS, PETEK (44)
- id -	raffinose	-	5,3	-
Plantago ovata				
1er enzyme	phényl-α-D-galactoside	5,1	1	TO DONG (I00)
2ème enzyme	- id -	-	0,5	-
Café (graines)				
1er enzyme	- id -	-	2,2	PETEK, TO DONG (88)
2ème enzyme	- id -	-	1	-

TABLEAU VI : Activité transférante des α-galactosidases

Enzymes	Donateur	Accepteur	Oligosaccharides synthétisés	Références
evure	Mélibiose	Mélibiose	Manninotriose	BLANCHARD, ALBON (I3) FRENCH (52)
afé	phényl-α-D-galactoside	Saccharose	Raffinose	ANAGNOSTOPOULOS, COURTOIS, PETEK (2)
- id -	- id -	Mannose	Epimélibiose	COURTOIS, PETEK (35)
- id -	- id -	Cellobiose	Galactosido-cellobiose	COURTOIS, PETEK (3
uzerne	- id -	Saccharose	Raffinose	ARNAUD (4)
lantain (graines)				
ler enzyme	- id -	Saccharose	Plantéose	TO DONG (I00)
ème enzyme	- id -	- id -	Raffinose	- id -

CHAPITRE II

MATERIEL ET TECHNIQUES

I. PREPARATION DES SUBSTRATS

1°) Préparation du mélibiose.

Pour la préparation du mélibiose cristallisé, nous avons eu recours à deux protocoles opératoires : le premier suit les principales lignes de la technique de HUDSON et HARDINGS (74). Cette méthode s'inspire des travaux de BAU (9) et de LOISEAU (8I), dont le principe repose sur la fermentation du raffinose par la levure haute. Le second se réfère à la technique de BAU (9) mais en remplaçant l'acide acétique dilué par l'acide sulfurique N/100 pour l'hydrolyse du raffinose.

a) Méthode de HUDSON et HARDINGS (74)

50 g de raffinose sont dissous dans 500 ml d'eau distillée; on ajoute 1 g de levure de boulangerie, 2 gouttes d'acide acétique 2N pour obtenir un pH voisin de 5,0 et 100 mg de malt fournissant à la levure des matières azotées et les facteurs de croissance nécessaires. Nous laissons fermenter à la température du laboratoire, en contrôlant, à l'aide d'un manomètre, le dégagement du gaz carbonique. Le pouvoir rotatoire qui était de + I02°5 atteint les valeurs + 70°2 après 24 heures, et + 78°5 après 96 et I20 heures de contact. L'abaissement initial du pouvoir rotatoire peut être expliqué par l'hydrolyse rapide du raffinose en mélibiose et en fructose qui s'accumule dans la

solution; l'augmentation qu'on observe par la suite est due vraisemblablement à la disparition du fructose par fermentation.

Nous clarifions la solution fermentaire par un léger excès d'acétate basique de plomb. Après centrifugation à 6000 t/minute pendant I5 minutes et élimination de l'excès de plomb par SH_2, nous décolorons au noir animal et nous centrifugeons de nouveau. L'excès de SH_2 est éliminé par barbottage prolongé d'un courant d'air. La solution est ensuite concentrée par ébullition sous pression réduite, puis additionnée d'éthanol à 95 p. I00 jusqu'à début de trouble. Un cristal de mélibiose est alors introduit pour amorçage.

La cristallisation spontanée du mélibiose est très difficile à obtenir. Après un repos de 4 jours à la glacière réglée à + 4°, le mélibiose cristallise en masse solide. Après séchage sous vide phosphorique pendant 24 heures, les cristaux sont broyés au mortier avec de l'alcool à 95° à la température ordinaire. Nous filtrons sur verre fritté G 3 et nous lavons rapidement à deux reprises avec 20 ml d'éthanol à 75 p. I00, puis encore une fois avec 20 ml d'éthanol à 95 p. I00.

Nous séchons les cristaux de mélibiose, d'abord sous vide phosphorique pendant 24 heures, ensuite pendant 1 heure à l'étuve réglée à 60°. Nous récoltons finalement 4,990 g de mélibiose cristallisé, ce qui correspond à un rendement de I4,7 p. I00.

b) Méthode de BAU (9).

10 g de raffinose sont dissous dans 200 ml d'acide sulfurique N/100; la solution est chauffée pendant 1 heure sur un bain-marie bouillant muni d'un réfrigérant à reflux. Après refroidissement, nous neutralisons par le carbonate de baryum et nous centrifugeons. Le surnageant est concentré sous pression réduite jusqu'à obtention d'un sirop épais. Celui-ci est alors introduit sur

une colonne de charbon célite (p/p) (charbon Pica VS 20, célite J. Mansville C°) de 68 cm de hauteur et 2,7 cm de diamètre.

Le fructose est alors totalement éliminé par élution avec l'eau distillée. Une élution par l'éthanol à I5 p. I00 permet de séparer ensuite différentes fractions contenant le mélibiose. Pour chacune d'elles, une vérification chromatographique sur papier Whatman n° 1 avec le solvant 7 : 1 : 2 nous assure de l'homogénéité du produit.

Les éluats renfermant le mélibiose sont réunis et concentrés sous pression réduite. L'addition d'éthanol à 95 p. I00 jusqu'à début de trouble et l'amorçage par un cristal de mélibiose provoque la cristallisation, après 4 jours de repos à la glacière (+ 4°). Nous récoltons 2,0 g de mélibiose cristallisé avec 2 molécules d'eau. Le rendement obtenu est de 3I,5 p. I00.

c) Constantes physiques du mélibiose obtenu

- point de fusion du dihydrate :

  = 89° - 90° (au bloc Maquenne)

- pouvoir rotatoire du dihydrate :

  $(\alpha)_D^{20°}$ = + I25° (eau)

  (A = 2,56 ; l = 0,5 ; c = 4,08 p. I00)

2°) Préparation du stachyose

Le stachyose a été préparé à partir des crosnes du Japon (Stachys tuberifera L) selon la technique généralement utilisée au laboratoire et qui est décrite en détail dans la thèse de ZANOUZI (II7).

3°) Préparation du phényl-α-D-galactoside.

Nous avons utilisé la technique préconisée par HELFERICH et SCHMIDT-HILLEBRECHT (60). Elle consiste en une condensation directe des phénols de points de fusion peu élevés avec les dérivés acétylés des oses.

4°) Préparation de la galactomannane.

Nous avons utilisé un protocole opératoire analogue à celui employé par WADMAN, ANDERSON et HASSID (I02) pour l'arabogalactane de Pinus Jeffreyi.

500 g de graines de Luzerne de Provence (Medicago sativa L.) sont finement pulvérisés au broyeur, délipidés par agitation avec du benzène et séchés à l'air jusqu'à évaporation complète du benzène. La poudre obtenue est mise à macérer durant 24 heures dans un litre d'eau distillée; le mélange est filtré sur papier et le résidu lavé à plusieurs reprises de façon à recueillir 3 litres de solution.

La solution est concentrée par distillation à 65° - 70° sous pression réduite jusqu'à un volume de 600 ml, centrifugée 1 heure à 6000 t/minute pour collecter les protéines dénaturées. Le liquide limpide est versé dans I300 ml d'alcool à 95°. Le précipité formé est recueilli par filtration et desséché sous vide : le rendement est de 42 g, soit 8,4 p. I00 de produit sec.

Les 42 g du corps sont alors dissous dans I050 ml d'eau distillée, des expériences préliminaires ayant montré qu'une concentration de 4 p. I00 ne devait pas être dépassée pour obtenir une bonne purification. La solution est éclaircie par centrifugation d'une heure à I0.000 t/minute.

Le précipité est séparé par filtration et desséché. On obtient ainsi 32 g de galactomannane.

Le produit est purifié par deux nouvelles reprises à l'eau, suivies de précipitation alcoolique dans les mêmes conditions que précédemment. Avant la dernière précipitation, on dialyse 24 heures contre l'eau distillée pour éliminer les glucides de faible poids moléculaire, on lave le précipité par l'acétone et on dessèche sous vide phosphorique.

Nous obtenons finalement, avec un rendement de 4 p. I00 à partir des graines initiales, un corps ayant, à l'état sec, les caractéristiques suivantes:

poudre blanche amorphe, peu hygroscopique, se dissolvant aisément dans 40 parties d'eau à la température du laboratoire pour donner une solution visqueuse.

$(\alpha)_D^{20°} = + 89°$ (dans l'eau)

(A = 0° 425 ; l = 0,5 ; c = 0,955 p. I00)

II. PREPARATION DES ENZYMES

1) Préparation de l'émulsine du Café.

La préparation enzymatique utilisée au cours de ce travail a été obtenue à partir de graines de Café selon le protocole opératoire de HELFERICH et VORSATZ (58).

La préparation possède aussi une faible activité de β-galactosidase.

2) Préparation de l'α-galactosidase de Penicillium paxillus

En traitant par l'eau physiologique une souche particulièrement riche de Penicillium paxillus, nous obtenons une préparation enzymatique possédant une forte activité α-galactosidasique. Elle renferme en outre diverses osidases que nous n'avons pu éliminer (29).

III. TECHNIQUES ANALYTIQUES

1) Chromatographie sur papier.

La méthode de chromatographie descendante sur papier, constamment utilisée au laboratoire, a été mise au point en I944, par CONSDEN, GORDON et MARTIN (24).

Le solvant parcourt le papier perpendiculairement à la ligne de départ : c'est le développement qui doit être réalisé dans une enceinte parfaitement close et préalablement saturée. La durée du développement varie, selon les cas, entre I0 heures et 8 jours. Le développement terminé, le papier est retiré de la cuve, séché et soumis à l'action du révélateur.

La composition des solvants couramment utilisés au laboratoire est indiquée dans le tableau VII.

TABLEAU VII : Solvants chromatographiques

	Composition des solvants (en vol.)	Observation
I	n-butanol.....9 pyridine.....5 eau.....4	Bonne séparation pour les mono- et les disaccharides
II	isopropanol.....7 n-butanol.....I eau.....2	Solvant très lent, bonne séparation des trisaccharides
III	acétate d'éthyle.....3 n-butanol.....4 acide acétique.....2,5 eau.....4	Séparation des oligo-saccharides supérieurs
IV	n-propanol.....5 ammoniaque.....4 eau.....I	Séparation des glucides et du glycérophosphate

Révélateurs

- Révélateur à la β-naphtylamine et au thymol

Composition :

β-naphtylamine..... 0,I0 g

thymol..... 1 g

acide phosphorique..... 2 ml

éthanol à 80..... I50 ml

Ce révélateur donne des taches colorées avec les holosides renfermant du fructose et avec les hexoses réducteurs. Les pentoses se colorent en rose, le fructose donne une teinte jaune clair, les holosides à fructose se colorent en jaune citron. Le glucose, le galactose, les holosides réducteurs contenant des aldoses donnent des taches marron.

- Révélateur au tétraacétate de plomb.

C'est une solution à 0,5 g p. I00 environ de tétraacétate de plomb dans l'éthanol absolu, préparée immédiatement avant l'emploi. Elle révèle tous les corps renfermant une fonction α-glycol en donnant des taches claires sur fond de couleur paille. Il est à signaler que les papiers ainsi révélés s'altèrent très rapidement.

2) Dosage des hexoses.

Les hexoses libérés ont été dosés par la méthode réductimétrique de SOMOGYI (97) et NELSON (83).

Le dosage s'effectue en deux temps :

1) les glucides réduisent à l'ébullition le réactif cupro-alcalin de SOMOGYI (97).

2) l'oxyde cuivreux réduit le réactif arséniato-molybdique de NELSON(83) en donnant des dérivés molybdeux de coloration bleue.

L'intensité de la coloration est mesurée au photomètre et les chiffres sont comparés à ceux obtenus avec une gamme étalon de l'hexose.

3) Dosage du méthanol combiné.

Une grande partie de nos essais de transfert ont été réalisés avec le

méthanol comme accepteur, ce qui nous a conduit à mettre au point le dosage du méthylgalactoside formé dans le milieu réactionnel. Le principe de ce dosage est le suivant : évaporation du méthanol non combiné, hydrolyse acide du galactoside, séparation par distillation du méthanol libéré qu'on recueille dans une solution nitrique de bichromate de potassium. L'oxydation chromique du méthanol est beaucoup plus difficile que celle de l'éthanol, CORDEBARD (25), POSTIC, COURTOIS et RABATÉ (90); pour l'oxyder totalement et régulièrement, il est nécessaire d'opérer à chaud en milieu nitrique assez concentré.

Nous avons finalement mis au point le protocole opératoire suivant :

10 ml de solution neutralisée sont évaporés à sec dans un large cristallisoir disposé sur un bain-marie bouillant, le résidu est repris par 5 ml d'eau distillée et évaporé à nouveau dans les mêmes conditions. L'extrait sec est dissous à froid dans 10 ml d'acide chlorhydrique N et placé dans une ampoule qu'on scelle avant de la plonger dans l'eau bouillante. Après 40 minutes d'hydrolyse, l'ampoule est refroidie, son contenu et les eaux de lavage sont introduits dans un appareil à distiller en verre rodé du type Nicloux, d'une capacité de 50 ml environ. D'autre part, dans un tube à essais, on mesure 10 ml de solution de chromate acide de potassium N/10 dans l'acide nitrique; le distillat est recueilli dans l'oxydant à l'aide d'un tube adducteur vertical relié au réfrigérant et débouchant, d'autre part, à la partie inférieure de la solution oxydante; par distillation à feu modéré, on recueille environ 10 ml de liquide. Le tube obturé par un système réfrigérant " doigt froid " est plongé durant 20 minutes dans un bain-marie bouillant. Après refroidissement l'excès de bichromate est titré par iodométrie, selon le protocole opératoire de POSTIC, COURTOIS et RABATÉ (90). Dans ces conditions expérimentales, le méthanol est oxydé totalement selon l'équation :

$$HCH_2OH + 3/2\ O_2 = CO_2 + 2\ H_2O$$

Nous avons vérifié que cette technique permet de doser avec précision des quantités de méthanol comprises entre 50 µg et 2 mg; d'autre part, elle fournit des résultats satisfaisants avec des solutions renfermant du méthanol, de l'α- ou du β-méthylglucoside et divers oses : glucose, galactose, mélibiose.

DEUXIEME PARTIE

ACTIVITES HYDROLYSANTES DES α-GALACTOSIDASES

-o-o-o-

CHAPITRE I

HYDROLYSE DES GALACTOSIDES DU SACCHAROSE

I. ACTION DE L'α-GALACTOSIDASE SUR LE STACHYOSE

INTRODUCTION

HERISSEY et coll. ont étudié l'oxydation, par l'acide periodique, du stachyose et du manninotriose qui en dérive (65) (43). Le stachyose réagit comme s'il avait la structure d'un α-D-galactopyranosido (1→ 6) α-D-galactopyranosido (1→ 6) α-D-glucopyranosido (1→ ←2) β-D-fructofuranoside. Ces résultats furent confirmés par LAIDLAW et WYLAM (78) qui étudièrent les produits de méthylation, puis par FRENCH, WILD et JAMES (54). Ces auteurs ont précisé la structure du manninotriitol et ont isolé, d'autre part, le raffinose, après action de l'émulsine d'amandes sur le stachyose. Parallèlement à cet ensemble de recherches, nous avons étudié l'action de diverses préparations enzymatiques sur le stachyose et sur le raffinose (54). La méthode chromatographique (chromatographie descendante sur papier) nous a permis d'identifier le raffinose dans les produits de l'hydrolyse partielle du stachyose par l'α-galactosidase des graines de Café ou par une préparation commerciale d'enzymes d'Aspergillus.

En vue de confirmer et de compléter ces essais, nous nous sommes proposé d'isoler et d'identifier le raffinose provenant de l'action de

l'enzyme du Café sur le stachyose. Nous avons recherché en outre si une hydrolyse α-galactosidasique plus poussée ne conduirait pas, par une scission du trisaccharide, au saccharose et au galactose NEUBERG (84), en faisant réagir l'émulsine d'amandes sur le raffinose, réussit à le scinder en saccharose et galactose.

Par contre, NEUBERG et LACHMANN (85), appliquant le même protocole opératoire au stachyose, ne réussirent pas à isoler le galactose et le saccharose dont on pouvait envisager la formation. Nous avons constaté nous-mêmes qu'après action prolongée de l'α-galactosidase du Café sur le stachyose, le mélange final possédait le pouvoir rotatoire et les propriétés réductrices d'un mélange de 2 molécules de galactose et d'une molécule de saccharose. Nous avons pu par ailleurs isoler et identifier le saccharose formé.

1°) Etude, en fonction du temps, de l'action de l'α-galactosidase sur le stachyose.

Nous avons suivi l'hydrolyse de mélanges possédant la composition suivante :

Solution M/20 de stachyose : 10 ml

Tampon acide acétique - soude de pH = 4,8 : 10 ml

Suspension à 4 p. 1000 d'émulsine du Café préparée selon la méthode de HELFERICH et VORSATZ (58) : 5 ml

Après contact plus ou moins prolongé à 37°, en présence de toluène, nous déféquons par 2 ml de solution d'acétate neutre de plomb à 10 p.100, nous complétons à 30 ml et nous filtrons.

Le tableau VIII indique, pour des durées de contact variant de 0 à 35 jours, la déviation polarimétrique du filtrat et son pouvoir réducteur sur

le réactif cupro-alcalin (méthode de LEHMANN avec le protocole opératoire de FLEURY et BOUTOT (49).

TABLEAU VIII : Action de l'α-galactosidase sur le stachyose

Durée de contact à 37° (en jours)	0	4	5	I0	2I	28	35
Déviation polarimétrique l = 2	+3°27	+2°48	+2°36	+2°06	+I°80	+I°73	+I°73
+Pourcentage des sucres totaux libérés par hydrolyse	0	27,5	29,3	38,2	46,8	49,9	49,9

+Calculé d'après le pouvoir réducteur du mélange des quatre molécules d'hexoses libérées par hydrolyse complète du stachyose.

La déviation polarimétrique et le pouvoir réducteur tendent à se stabiliser après 28 jours d'hydrolyse. Dans le cas où l'α-galactosidase aurait scindé le stachyose en deux molécules de galactose et une de saccharose, la déviation polarimétrique finale serait de +1°74, nombre qui concorde avec la valeur obtenue expérimentalement.

D'autre part, lorsque l'hydrolyse est stabilisée, le pouvoir réducteur correspond à la libération de deux des quatre hexoses associés dans le stachyose. Les deux hexoses libérés sont des aldoses; nous avons titré par l'hypoïodite les aldoses libérés après 35 jours de contact; pour la totalité du mélange réactionnel nous trouvons I83,6 mg d'aldohexoses, alors que l'hydrolyse α-galactosidasique prévoit la libération de I80 mg de galactose.

L'ensemble des résultats que nous venons d'exposer conduit à représenter l'action hydrolysante de l'α-galactosidase sur le stachyose par le schéma suivant :

1 stachyose + 2 OH_2 ---------- 2 galactose + 1 saccharose
α-galactosidase

2°) Isolement du saccharose.

Nous avons utilisé le protocole opératoire suivant :

2,24 g de stachyose à 5 molécules d'eau d'hydratation sont dissous dans 10 ml de tampon acide acétique - soude , de pH = 4,8. On ajoute 5 ml de suspension d'émulsine du Café à 0,67 g p. 100.

Après 10 jours de contact à 37°, le dosage à l'aide du réactif cuprosodique indique la libération de 21 p. 100 de la totalité des sucres combinés dans le stachyose.

Le saccharose est alors séparé du mélange réactionnel par chromatographie sur une colonne de poudre de papier. 125 g de poudre de cellulose (Whatman, standard grade) mis en suspension dans l'acétone anhydre, sont introduits dans une allonge en verre munie d'un robinet et mesurant 60 cm de longueur et 2,6 cm de diamètre intérieur. Après tassement, la colonne de papier mesurant 46 cm de hauteur est lavée à l'aide du solvant proposé par HOUGH, JONES et WADMAN(71): n. butanol : 75 parties, éthanol : 7,5 parties, ammoniaque à 1 p. 100 : 17,5 parties.

10 ml du mélange réactionnel sont versés peu à peu à la partie supérieure de la colonne; après absorption par le papier, on introduit le solvant de HOUGH et coll. sur une épaisseur de 3cm; on règle l'écoulement de manière à obtenir, à la base de la colonne, un débit de 10 gouttes environ par minute; ces gouttes sont collectées par fractions de 10 ml.

Les sucres élués dans chaque fraction sont identifiés à l'aide de quelques gouttes déposées sur papier et évaporées; par chauffage pendant 10 minutes à 90° avec une solution phosphorique d'aniline, le galactose donne une coloration marron; en 15 minutes, à 105°, une solution phosphorique de

β-naphtol révèle le saccharose en vert bleu.

Aucun des deux sucres n'est élué dans les 560 premiers ml, le galactose passe entre 560 et 680 ml, de petites quantités de saccharose y sont associées dans les 220 ml suivants; la fraction recueillie entre 900 et 1050 ml renferme principalement du saccharose souillé par de faibles quantités de galactose. Enfin, entre 1050 et 1500 ml, le solvant n'élue que du saccharose. Ces 450 ml de solution sont concentrés à 2 ml par distillation sous vide; le résidu sirupeux est épuisé par 30 ml d'alcool absolu bouillant pendant 30 minutes sous réfrigérant à reflux. Après refroidissement, la solution est amorcée avec un petit cristal de saccharose et additionnée de 2 gouttes d'acide acétique glacial et de 3 ml d'éther.

Après repos de 2 semaines à la glacière, on recueille finalement 80 mg d'un corps fondant à + 174° dans un tube; recristallisé dans les mêmes conditions, le saccharose témoin fond à + 180° et le mélange des deux corps à + 176°. Au bloc Maquenne, le corps isolé a même point de fusion, + 189° (non corrigé) que le saccharose témoin.

Le pouvoir rotatoire trouvé est égal à + 66°, alors que celui du saccharose est $(\alpha)_D^{18} = + 66°5$.

3°) Isolement du raffinose.

La faible solubilité du raffinose dans le solvant utilisé et son lent cheminement dans la colonne ne nous ayant pas permis d'éluer le raffinose après le saccharose, nous avons eu recours à la technique suivante : reprenant le même protocole opératoire que pour l'isolement du saccharose, nous avons limité la durée de l'hydrolyse à 8 jours à 37°; 18,7 p. 100 des sucres associés dans le stachyose sont alors libérés et le raffinose est isolé par chromatographie sur papier d'Arches 1030.

Chaque feuille (24 cm de largeur, 40 cm de hauteur) reçoit 90 microgouttes

de l'hydrolysat (0,0089 ml), réparties en 9 points équidistants sur une ligne horizontale. Après dessiccation activée par un léger chauffage, nous prodédons à une chromatographie descendante avec le mélange : n-butanol, pyridine, benzène, eau : 5, 3, 1, 3 en volume ; la phase supérieure est utilisée comme solvant, la couche inférieure étant conservée pour saturer l'atmosphère de la cuve. Après 10 jours à la température du laboratoire, nous retirons la feuille de la cuve et, après séchage, nous en révélons une bande étroite découpée dans le sens de la hauteur; le réactif : aniline : 0,4 ml; thymol : I,5 g; acide phosphorique sirupeux : 1,5 ml; alcool à 80° : I50 ml donne, après 10 minutes de chauffage à 90°, une coloration marron pour le raffinose.

Des essais préliminaires avec un mélange de stachyose, raffinose, saccharose et galactose, nous avaient permis de vérifier que cette technique permet de séparer nettement le raffinose des autres sucres associés.

Huit feuilles de papier sont traitées de la manière décrite; nous découpons dans chacune d'elles la zone correspondant au raffinose et le sucre est extrait par 200 ml d'eau bouillante; l'éluat est filtré, puis concentré à 1 ml par distillation sous vide. Le résidu est repris par 25 ml de n-butanol, avec une goutte d'acide acétique et conservé à la glacière; les cristaux, qui se déposent lentement, sont recueillis après une semaine, lavés à l'alcool absolu et séchés.

Nous obtenons finalement 10 mg d'un solide blanc cristallisant comme le raffinose, homogène par chromatographie sur papier et migrant comme le raffinose. L'échantillon obtenu fournit le même diagramme de diffraction aux rayons X que le raffinose recristallisé dans les mêmes conditions[+](Tableau IX).

[+]Nous exprimons nos plus vifs remerciements à M. P. LARUELLE qui a obligeamment procédé à cette détermination.

TABLEAU IX : Diagrammes de diffraction aux rayons X

Echantillon isolé		Raffinose témoin	
d en A	intensité relative des bandes	d en A	intensité relative des bandes
8,58	intense	8,85	intense
7,26		7,26	
6,69	intense	6,73	intense
6,20		6,26	
5,41	intense	5,47	intense
4,95		5,00	
4,63		4,65	
4,28	intense	4,29	intense
3,80		3,79	
3,63		3,64	
3,47		3,49	
3,18		3,17	
3,08		3,09	
2,89		2,89	
2,75		2,75	
2,53		2,53	
2,34	intense	2,35	intense
2,20		2,21	
1,99	intense	1,99	intense
1,87		1,87	

Nous pouvons donc conclure que l'hydrolyse α-galactosidasique partielle du stachyose a rompu la liaison (1→ 6) unissant les deux molécules de galactose et conduit au raffinose.

CONCLUSION

L'α-galactosidase des graines de Café hydrolyse le stachyose en deux étapes; il y a tout d'abord détachement d'une molécule de galactose et formation de raffinose; ce dernier est ensuite scindé en galactose et saccharose. Le raffinose et le saccharose ainsi libérés ont pu être isolés et identifiés.

II. ACTION DE L'α-GALACTOSIDASE SUR DIVERS GALACTOSIDES DU SACCHAROSE ET DU GLUCOSE

COURTOIS et coll. ont montré que l'α-galactosidase du Café détache sélectivement le galactose terminal non substitué des α-galactosides du saccharose, ainsi que des α-galactosides du glucose correspondants : c'est ainsi que l'ajugose est d'abord dégradé en verbascose par perte de galactose terminal, puis successivement en stachyose, en raffinose et enfin en saccharose (26) (42).

Le stachyose est hydrolysé plus lentement que le raffinose : en général, l'allongement de la chaîne par addition d'unités de galactose ralentit la vitesse d'hydrolyse, il en est de même pour les mono-, di-, tri-, tétra-, et penta-α-D-galactosides du glucose obtenus à partir des galactosides du saccharose (26) (42).

CHAPITRE II

HYDROLYSE DE LA GALACTOMANNANE

I. ACTION DE L'α-GALACTOSIDASE DU CAFE

INTRODUCTION

L'action des enzymes sur les galactomannanes n'a provoqué qu'un nombre limité de publications.

Dès 1900, BOURQUELOT et HÉRISSEY (16) (17) (18) ont signalé que les graines de Légumineuses et d'Aspergillus niger renfermaient des enzymes libérant du galactose et du mannose à partir des galactomannanes.

LEW et CORNER (80) ont observé une hydrolyse rapide, par la taka-diastase, de la galactomannane du Caroubier, tandis que l'émulsine ou la salive demeuraient pratiquement sans effet.

WHISTLER et ses collaborateurs (114) (116) ont montré que la guarane, extraite des graines de Guar (Cyamopsis tetragonolaba Légumineuse), était hydrolysée par un enzyme extrait par l'eau de ces graines germées et précipité par le sulfate d'ammonium. Cette préparation enzymatique renferme des galactosidases et des mannosidases associées; elle conduit à un mélange de galactose, de mannose et de saccharides, produits intermédiaires de l'hydrolyse. L'un d'eux a été isolé et identifié au β-mannosido (1→ 4) mannose, sucre obtenu par hydrolyse acide partielle de la guarane (112).

A notre connaissance, les galactomannanes n'ont pas été soumises à l'action d'enzymes attaquant sélectivement soit les liaisons α-galactosidiques, soit les liaisons β-mannosidiques.

Nous nous sommes proposé d'étudier l'action de divers enzymes sur les galactomannanes. Nous avons porté notre choix sur celle de la Luzerne qui, d'après WHISTLER et SMART (II5), serait la galactomannane pour laquelle le rapport moléculaire galactose/mannose serait le plus élevé.

PARTIE EXPERIMENTALE

Nous avons suivi l'action hydrolysante de l'α-galactosidase du Café sur la galactomannane selon le protocole opératoire suivant :

a) 0,665 g de galactomannane sont dissous dans un peu d'eau; on ajoute 10 ml de tampon acide acétique - soude de pH 5,0 et 0,1 g de préparation enzymatique de Café; on complète à 50 ml avec de l'eau distillée et on maintient le mélange à 37°.

Après deux jours, la chromatographie sur papier ne permet de déceler qu'un seul ose libéré, le galactose, qu'on élimine par dialyse. Le polysaccharide résiduel, précipité par l'éthanol est purifié par reprise à l'eau, dialyse et nouvelle précipitation; cette opération est répétée deux fois.

Après hydrolyse sulfurique, nous identifions le mannose et le galactose par la technique chromatographique. Les deux oses sont élués selon la méthode indiquée par LAIDLAW et REID (77), puis dosés à l'aide du réactif NELSON (83) et SOMOGYI (97). Nous trouvons alors pour le rapport moléculaire mannose/galactose le nombre 2,0.

b) Nous procédons à une hydrolyse de plus longue durée dans les mêmes conditions opératoires que précédemment, mais en mettant en oeuvre I,426 g de polysaccharide et 0,20 g d'enzyme. Après 2 jours, nous ajoutons à nouveau

0,20 g d'enzyme. Au bout d'une semaine, la quantité de galactose libéré ne paraît plus augmenter.

Nous dialysons contre de l'eau distillée :

1) la fraction non dialysable est purifiée par filtration, précipitation alcoolique, reprise par l'eau, dialyse et nouvelle précipitation, ces opérations étant répétées trois fois. Nous recueillons 0,88 g d'une substance blanche, amorphe, non réductrice, dextrogyre $(\alpha)_D$ = + 57°6. Le rapport moléculaire mannose/galactose est déterminé comme pour l'essai a); il s'est élevé à 3,6I.

Le polysaccharide obtenu mis en contact avec la préparation enzymatique du Café ne libère pratiquement pas de galactose après 24 heures, mais il fournit une faible quantité de mannose.

2) La solution aqueuse à l'extérieur du dialyseur est concentrée jusqu'à consistance sirupeuse par distillation sous pression réduite. Elle est introduite sur une colonne de charbon; le galactose est élué par l'eau distillée et l'éluat est concentré sous pression réduite jusqu'à l'obtention d'un sirop épais.

Par repos à la température du laboratoire, il se dépose progressivement des cristaux; après I5 jours, ils sont récoltés, séchés sous vide phosphorique puis recristallisés une seconde fois dans les mêmes conditions.

Le corps obtenu est homogène par chromatographie et migre comme un échantillon témoin de D-galactose.

Vis-à-vis de la liqueur cupro-alcaline, il présente le même pouvoir réducteur que le galactose témoin.

Il s'agit du D-galactose cristallisé sous sa forme α. La rotation dextrogyre de sa solution aqueuse s'abaisse progressivement et atteint à l'équilibre un pouvoir rotatoire égal à + 75°47 (t = I0°C ; A = + I°,2; l = 1; c = I,59p.100)

CONCLUSION

L'α-galactosidase du Café libère progressivement du galactose à partir de la galactomannane de Luzerne; ce galactose paraît être le seul corps libéré; il n'est associé ni à du mannose, ni à d'autres saccharides de faible poids moléculaire.

Après action de l'enzyme, une dialyse permet de séparer le galactose libéré par hydrolyse partielle à partir du polysaccharide.

Le galactose, ayant franchi la membrane, a été isolé, concentré et purifié par passage sur colonne de charbon, élué et cristallisé. Le corps obtenu a été identifié au D-galactose cristallisé sous la forme α.

Le polysaccharide partiellement hydrolysé par l'enzyme est précipité par l'éthanol; nous y déterminons le rapport mannose/galactose. Après 2 jours de contact avec l'enzyme, nous obtenons un produit pour lequel le rapport moléculaire mannose/galactose s'est élevé à 2,0. Après 8 jours de contact avec une plus forte dose d'enzyme, le corps isolé de pouvoir rotatoire $(\alpha)_D^{20} = +57°6$, donne, pour le rapport moléculaire mannose/galactose le nombre 3,6I.

Ce corps, mis à nouveau en contact avec l'enzyme du Café, ne subit qu'une attaque insignifiante avec mise en liberté de très faibles quantités de mannose. L'action de l'enzyme du Café se montre nettement plus spécifique que celle d'autres préparations dont nous poursuivons l'étude.

L'α-galactosidase du Café paraît avoir attaqué des molécules qui seraient branchées sur des chaînes centrales, où prédomineraient les unités de mannose.

L'enzyme détacherait donc les molécules de galactose retrouvées après méthylation puis hydrolyse de la galactomannane de Luzerne sous forme de tétraméthyl-2,3,4,6-D-galactose par HIRST, JONES et WALDER (67), puis par ANDREWS, HOUGH et JONES (3).

HIRST, JONES et WALDER (67) ont signalé en outre, dans l'hydrolysat, la présence du triméthyl-2,4,6-D-galactose que ANDREWS, HOUGH et JONES (3) n'ont pas retrouvé.

Nous nous proposons de rechercher si ce galactose, éventuellement substitué en 3, ne serait pas en rapport avec le galactose présent dans la fraction isolée après hydrolyse α-galactosidasique et dans laquelle le rapport mannose/galactose s'est élevé à 3,6I.

Il existe de telles divergences entre les caractères des galactomannanes de Luzerne étudiées par les deux groupes d'auteurs (67) (3) que toute comparaison plus poussée avec nos résultats serait prématurée.

II. ACTION DE LA TAKA-DIASTASE

INTRODUCTION

Dans le chapître précédent, nous avons étudié l'action de l'α-galactosidase du Café sur la galactomannane de Luzerne. Nous avons montré qu'il y a libération sélective de D-galactose; l'hydrolyse ne détache pas la totalité du galactose et on obtient finalement un polysaccharide dans lequel le rapport moléculaire mannose/galactose s'est élevé à 3,6I.

L'action de la taka-diastase est moins sélective que celle de l'α-galactosidase du Café. A pH 4,75, on observe, dès la première demi-heure, une libération de galactose. Après 3 heures, le mannose commence à apparaître et la chromatographie sur papier met en évidence une faible quantité d'un corps migrant comme un disaccharide. L'intensité de la tache correspondant au disaccharide s'accentue jusqu'au troisième jour; il se produit ensuite un début d'hydrolyse de ce disaccharide, pendant que le galactose et le mannose continuent à s'accumuler dans le milieu. Les hexoses et le disaccharide sont séparés

par dialyse de la fraction du polysaccharide non hydrolysée.

Le dialysat concentré a été soumis à une chromatographie sur colonne de charbon, puis à une chromatographie circulaire sur papier. Après élution, le disaccharide a été obtenu à l'état cristallisé et identifié au β-D-mannopyranosyl (1→ 4) D-mannose. Ce corps lévogyre, $(\alpha)_D^{20°} = -7°3 \rightarrow -4°2$ a cristallisé sous sa forme β. Il migre comme un échantillon témoin de mannobiose, obtenu par WHISTLER et STEIN (II6) par hydrolyse enzymatique partielle de la galactomannane des graines de Guar. Le disaccharide est hydrolysé par l'acide sulfurique dilué en deux molécules de mannose.

L'oxydation partielle par le tétraacétate de plomb selon la technique de PERLIN (87) élimine les atomes de carbone 1 et 2 du mannose réducteur et conduit à un β-D-mannopyranosyl (1→ 2) D-érythrose selon le schéma indiqué par CHARLSON et PERLIN (2I) pour le mannosido (1→ 4) mannose.

Enfin, l'oxydation du disaccharide par un excès d'acide periodique évolue comme celle d'autres disaccharides (1→ 4) : maltose et lactose; l'oxydation du mannobiose est cependant plus lente que celles du maltose ou du lactose.

L'isolement du mannopyranosyl (1→ 4) mannose par hydrolyse enzymatique de la galactomannane de Luzerne est à rapprocher de l'isolement du même corps par WHISTLER et STEIN (II6) après attaque de la guarane par les enzymes des graines de Guar. La guarane est la galactomannane dont la structure est la mieux définie (WHISTLER et coll. (II6) (1) (II4) (II2)); elle est constituée par une chaîne centrale d'unités β-mannopyranose reliées en (1→ 4) sur laquelle se branchent des unités α-galactopyranose fixées sur des fonctions alcool primaire du mannose. Une structure similaire paraît assez probable pour la galactomannane de Luzerne, mais dont les branchements galactose seraient plus nombreux, ou plus allongés que pour la guarane.

Les arguments suivants sont en faveur de cette hypothèse :

1). ANDREWS, HOUGH et JONES (3) ont isolé de graines de Luzerne une galactomannane, différant légèrement par son rapport galactose/mannose et par son pouvoir rotatoire de celle que nous avons obtenue (28). Le polysaccharide de ANDREWS et coll. (3) conduit par méthylation suivie d'hydrolyse, à un mélange de tétraméthyl-2,3,4,6-D-galactose, triméthyl-2,3,6-D-mannose, et diméthyl-2,3-D-mannose; les unités mannose paraissent bien reliées par des liaisons (1→4) avec rattachement en 6 des branchements galactose. HENDERSON, HOUGH et PAINTER (6I) ont signalé que l'hydrolyse acide partielle de la galactomannane de Luzerne permet d'en séparer du β-mannosido (1→ 4) mannose.

2). L'existence de branchements galactose est confirmée par l'action des enzymes : libération du seul galactose par l'α-galactosidase du Café (chapitre précédent), apparition du galactose au début de la réaction et avant le mannose par action des enzymes de la taka-diastase.

3). L'obtention d'un mannosido (1→ 4) mannose après action de la taka-diastase tend à confirmer que cette structure préexiste dans la galactomannane. Le mannobiose libéré paraît cependant correspondre à un produit d'hydrolyse partielle; l'obtention d'un disaccharide à partir des galactomannanes est à rapprocher de celle de deux autres disaccharides (1→ 4) isomères du mannobiose par hydrolyse enzymatique partielle : le maltose à partir des amidons et le cellobiose à partir des celluloses.

Nous avons par ailleurs séparé la fraction non dialysable de la galactomannane de Luzerne qui avait été mise en contact avec la taka-diastase. Cette fraction est précipitée par l'alcool, reprise par l'eau, dialysée à nouveau et reprécipitée par l'alcool. Après 3 jours de contact avec la taka-diastase, la fraction résiduelle a un pouvoir rotatoire égal à + 75°1 et contient du galactose et du mannose en proportions sensiblement équimoléculaires. Cette fraction, mise à nouveau en contact avec de la taka-diastase, libère du galactose et du

mannose ainsi qu'une faible quantité de diholoside. Après 3 jours de contact avec l'enzyme, ce polysaccharide résiduel est purifié par dialyse, puis précipité par l'alcool; le rapport moléculaire galactose/mannose demeure voisin de 1,0.

PARTIE EXPERIMENTALE

1) Matériel et techniques.

La galactomannane de Luzerne a été préparée selon le protocole préconisé par COURTOIS, ANAGNOSTOPOULOS et PETEK (28). Comme source d'enzyme, nous avons utilisé la taka-diastase Sankio. Pour l'identification chromatographique et le dosage des oses libérés, nous avons eu recours aux techniques décrites par COURTOIS, ANAGNOSTOPOULOS et PETEK (28).

2) Etude de l'évolution de l'hydrolyse.

100 ml de solution à 5 p. 100 de galactomannane sont additionnés de 20 ml de tampon acide acétique - soude de pH 4,75 et de 2 g de taka-diastase. Le mélange est maintenu à + 37° et l'évolution de l'hydrolyse est appréciée par chromatographie sur papier.

Après 30 minutes, le seul ose décelable est le galactose. Après 3 heures, la tache de galactose s'est intensifiée, en même temps qu'apparaît nettement celle du mannose; on observe en outre une tache très faible, de R_f sensiblement inférieur.

De 3 heures à 85 heures, les taches du galactose, du mannose et du disaccharide deviennent de plus en plus intenses.

Après 85 heures de contact, la tache du disaccharide décroît progressivement, tandis que celles du galactose et du mannose sont de plus en plus importantes. Il apparaît également quelques composés de mobilités intermédiaires entre celle du polysaccharide et celle du disaccharide; l'un de ces corps a une mobilité qui l'apparente à un trisaccharide.

Ces divers produits intermédiaires de l'hydrolyse sont toujours en très faible quantité et nous n'avons pu réussir à les isoler.

Des essais témoins réalisés soit avec la galactomannane et le tampon soit avec la taka-diastase et le tampon ne permettent pas d'observer la libération de galactose, de mannose ou de disaccharide.

3) Isolement du disaccharide.

Après 90 heures de contact avec la taka-diastase, le pouvoir réducteur du milieu réactionnel sur le réactif cupro-alcalin correspond à 43,2 p. 100 de celui de l'ensemble des oses libérés dans l'hydrolyse acide totale de la galactomannane; la solution est neutralisée par le carbonate de calcium et portée cinq minutes à l'ébullition pour inactiver les enzymes; le précipité de taka-diastase insoluble est éliminé par centrifugation. Le liquide surnageant est dialysé pendant 24 heures contre 2 litres d'eau distillée, cette opération étant répétée 3 fois.

a) La fraction non dialysable est précipitée par 3 volumes d'alcool à 95°, reprise par l'eau, centrifugée, dialysée et précipitée à nouveau par l'alcool. La poudre blanche obtenue, en solution aqueuse à 1 p. 100, a un pouvoir rotatoire de + 75°1.

Une hydrolyse complète par l'acide sulfurique dilué libère des quantités sensiblement équimoléculaires de galactose et de mannose. Le polysaccharide est soumis à l'action de la taka-diastase dans les mêmes conditions opératoires que pour la galactomannane initiale : il y a libération de galactose, de mannose et d'une quantité plus restreinte de disaccharide. Après 3 jours, le pouvoir réducteur du mélange sur le réactif cupro-alcalin correspond à la libération de 42 p. 100 des oses associés dans le polysaccharide. La fraction non hydrolysée est purifiée par dialyse et précipitation alcoolique; le rapport galactose/mannose demeure voisin de 1,0.

Le polysaccharide est à nouveau mis en contact pendant 3 jours avec la taka-diastase; la nouvelle fraction non hydrolysée est purifiée comme l'ont été les précédentes; le rapport moléculaire galactose/mannose n'a pas subi de modification appréciable.

Les contenus des sacs de dialyse sont concentrés par distillation sous pression réduite jusqu'à consistance sirupeuse. Le sirop est introduit dans une colonne de charbon Pica V S 20 de 40 cm de hauteur et 3 cm de diamètre intérieur. L'eau distillée élue le galactose et le mannose; l'alcool à 4° élue ensuite le disaccharide dont la solution est évaporée à sec. Le résidu est alors purifié par chromatographie circulaire sur papier Whatman n° 3 avec le mélange solvant isopropanol/10, méthanol/8, eau/4 en volumes. La couronne circulaire correspondant au disaccharide est découpée, éluée par l'eau chaude et concentrée par distillation sous pression réduite. Une nouvelle chromatographie circulaire est réalisée dans les mêmes conditions, mais sur papier Whatman n° 1. L'échantillon obtenu est chromatographiquement homogène.

Ces diverses opérations ont conduit à un rendement moyen de 200 mg de disaccharide pour 5 g de galactomannane; la séparation sur colonne de charbon peut être remplacée par une chromatographie circulaire sur papier Whatman n°1.

200 mg de disaccharide sont dissous à chaud dans 50 ml de méthanol renfermant 2 p. 100 d'eau; après addition de 20 ml de n-butanol, la solution est placée dans un exsiccateur renfermant de l'anhydride phosphorique et soumise à un vide partiel. La solution se concentre et, après deux jours, des cristaux apparaissent; ils sont recueillis après une semaine, lavés par l'éthanol absolu et desséchés sous vide; nous obtenons 67,5 mg de cristaux.

4) Identification du disaccharide.

a) Le corps obtenu est lévogyre; son pouvoir rotatoire instantané est égal à -7°3;

il atteint -4°2 à l'équilibre (solution aqueuse à 6,35 p. I00).

WHISTLER et STEIN (II6) indiquent pour le β-D-mannopyranosyl (1→ 4)-D-mannopyranose cristallisé sous sa forme β : α_D = - 7°7 au début et - 2°2 à l'équilibre.

b) Le disaccharide isolé migre sur papier comme un échantillon témoin du corps de WHISTLER et STEIN; cette identification chromatographique est confirmée par trois essais avec des mélanges solvants différents.

c) Le disaccharide est réducteur; 100 mg de corps ont le même pouvoir réducteur vis-à-vis du réactif cupro-alcalin de NELSON-SOMOGYI (83) (97) que 58 mg de mannose.

Une solution de 2,254 mg de disaccharide dans 4 ml d'acide sulfurique 0,5 N est introduite dans une ampoule scellée plongée trois heures dans un bain-marie bouillant. La chromatographie sur papier ne permet de déceler dans l'hydrolysat que le seul mannose.

La quantité de mannose dosée par la méthode NELSON-SOMOGYI est de 2,4I4 mg rapportée aux 4 ml de l'essai. Le chiffre théorique pour le mannobiose est : 2,372 mg.

d) L'oxydation partielle par le tétraacétate de plomb a été réalisée selon le protocole de PERLIN (87) (2I).

I0 mg de disaccharide sont dissous dans 0,2 ml d'eau distillée additionnée de 2 ml d'acide acétique cristallisable, puis de 5 ml de solution acétique de tétraacétate de plomb à 1 p. I00. Le mélange est porté 5 heures à 28°; nous ajoutons un excès d'acide oxalique; après 30 minutes, nous centrifugeons pour éliminer l'oxalate de plomb, nous distillons à sec sous pression réduite et nous reprenons le résidu par I0 ml d'eau distillée. La solution est hydrolysée par chauffage pendant 3 heures au bain-marie bouillant.

Le produit d'hydrolyse est soumis à la chromatographie sur papier avec

trois mélanges solvants différents.

En utilisant le lactose comme disaccharide témoin, nous obtenons un spot de galactose et un de D-érythrose. Avec le mannobiose, nous observons un spot de mannose et un autre qui a migré chaque fois comme le D-érythrose dérivant du lactose.

Le tétraacétate a donc éliminé les carbones 1 et 2 du mannose réducteur, ce qui indique que le mannobiose a la configuration 1→4 (2I).

e) Nous avons oxydé par l'acide periodique, à la température du laboratoire et dans l'obscurité, le mannobiose, le lactose et le maltose.

Les quantités d'acide periodique réduit, en molécules par rapport à une molécule de disaccharide, sont les suivantes :

Durée d'oxydation	1h	1j	4j	7j	10j	19j
Lactose	3,9	10,2	10,7	10,8	10,8	
Maltose	3,8	9,9	10,2	10,6	11,6	
Mannobiose	3,0	6,8	7,3	7,6	8,2	11,8

L'acide formique libéré au cours de l'oxydation a été titré par acidimétrie. Nous avons obtenu les résultats suivants (en molécules d'acide monovalent pour une molécule de disaccharide).

Durée d'oxydation	1h	1j	4j	7j	10j	19j
Lactose	2,3	8,5	8,9	8,8	8,8	
Maltose	2,2	8,4	8,5	8,6	8,6	
Mannobiose	1,5	4,8	5,2	5,8	6,1	8,9

Les trois disaccharides sont oxydés selon l'équation générale :

$$C_{12}H_{22}O_{11} + 11/2\ O_2 = CO_2 + 2\ HCHO + 9\ HCO_2H$$

Nous avons vérifié par ailleurs qu'il y avait libération de formaldéhyde. L'oxydation s'effectue par étapes comme l'ont signalé COURTOIS et RAMET(39); dans le cas des disaccharides (1→6), l'oxydation est moins poussée et ne

libère pas de formaldéhyde (35). Il est à remarquer que l'attaque du mannobiose est nettement plus lente que celle du lactose et du maltose.

CONCLUSION

La taka-diastase contient des enzymes hydrolysant la galactomannane de Luzerne. Il y a tout d'abord libération de galactose, puis de mannose et d'un disaccharide qui a été isolé et identifié au β-D-mannopyranosyl (1→4)-D-mannose.

L'ensemble des résultats exposés dans ce chapître tend à indiquer que l'α-galactosidase de la taka-diastase détache en premier lieu les chaînes latérales de galactose tandis que la β-mannosidase libère des unités mannose qui ne sont plus osidifiées par le galactose.

III. ACTION DE L'α-GALACTOSIDASE DE PENICILLIUM PAXILLUS

L'α-galactosidase présente dans une préparation enzymatique de Penicillium paxillus est sans action sur la galactomannane de Luzerne, alors qu'elle attaque les α-galactosides de phénol et de méthanol, ainsi que les oligosaccharides renfermant du galactose osidifié sous forme α (29).

L'α-galactosidase de P. paxillus paraît donc avoir une spécificité moins étendue que les α-galactosidases des graines de Café et de la taka-diastase qui sont susceptibles de détacher les molécules de galactose reliées à la chaîne centrale d'unités mannose.

Elle attaque l'hydrolysat résultant de l'action de l'enzyme du Café sur la galactomannane de Luzerne et dans lequel le rapport moléculaire mannose/galactose s'est élevé à 3,61; elle en libère une forte proportion de mannose et une faible quantité de galactose, comme en témoignent les intensités respectives des taches révélées sur les chromatogrammes.

En faisant réagir sur la galactomannane de Luzerne un mélange des enzymes de Café et de P. paxillus, on observe par chromatographie la libération du seul galactose après 24 heures à 37°, le mannose n'apparaît qu'après 2 jours.

TROISIEME PARTIE

ACTIVITES TRANSFERANTES DES α-GALACTOSIDASES

-o-o-o-

CHAPITRE I

OBTENTION DE METHYL-α-D-GALACTOSIDE

INTRODUCTION

En 1935, RABATÉ fut le premier à mettre en évidence une réaction de transfert biochimique direct d'oses en présence d'une préparation enzymatique de feuilles de Saule (92). Il réussit à transférer le glucose d'un β-glucoside de phénol (salicoside ou picéoside), agissant comme donateur, sur divers alcools accepteurs (méthanol, n-pentanol, alcool benzylique). Par la suite, RABATÉ étendit cette réaction à d'autres osidases d'origine végétale; employant l'éthanol comme accepteur, il put réaliser les trois transferts : du primérose à partir du monotropitoside (β-primévéroside du salycilate de méthyle) (93); du rutinose à partir du lusitanicoside (rutinoside du chavicol); du vicianose à partir du géoside (vicianoside de l'eugénol) (94).

Depuis cette découverte, de nombreuses réactions de transfert d'oses ont été mises en évidence : les donateurs les plus fréquemment utilisés sont des holosides; les oses sont transférés soit sur des alcools acycliques, soit sur des oses et des holosides. Ces actions transférantes ont surtout été réalisées avec des préparations fermentaires d'Aspergillacées et de levures; elles ont permis la synthèse d'holosides nouveaux, dont certains purent être isolés et étudiés afin d'en préciser la constitution. Ces divers travaux ont déjà fait l'objet de nombreuses revues générales : citons, par exemple, pour les réactions de transfructosylation, les revues de BACON (6), DEDONDER (45), EDELMAN(4

Nous avons constaté que l'enzyme du Café pouvait catalyser le transfert de l'α-galactose, à partir du mélibiose, du raffinose et du stachyose, sur divers alcools et sucres. Avec le mélibiose donateur et le méthanol accepteur, nous avons pu isoler et identifier le méthyl-α-D-galactoside formé par transfert.

PARTIE EXPERIMENTALE

I°) Essais de transfert avec le mélibiose comme donateur

Dans un flacon stérile, nous introduisons successivement : 10 ml de mélibiose M/10, 5 ml de méthanol absolu, 5 ml de tampon acide acétique-soude de pH 5,0 et 5 ml d'une suspension à 0,80 p. 100 d'émulsine des graines de Café, préparée selon le protocole d'HELFERICH et VORSATZ (58). Après des temps de contact variant de 0 à 9 jours, à 37°, nous déféquons par 2 ml de sous-acétate de plomb, nous séparons le précipité par filtration et nous complétons à 30 ml. Nous réalisons en outre une série d'essais parallèles en substituant au méthanol un volume égal d'eau distillée. Nous avons rassemblé, dans le tableau X, les valeurs du pouvoir réducteur et de la déviation polarimétrique.

Dans l'essai réalisé en l'absence du méthanol la diminution régulière de la déviation polarimétrique et l'augmentation parallèle du pouvoir réducteur évoluent régulièrement, comme au cours d'une hydrolyse du mélibiose en glucose et galactose. En présence de méthanol, la diminution de la rotation et l'augmentation du pouvoir réducteur s'effectuent à un rythme nettement plus lent; après six jours de contact, un certain état d'équilibre tend même à s'établir.

TABLEAU X : Action de l'α-galactosidase sur le mélibiose, avec ou sans méthanol

Durée de contact (en jours)		0	1	2	3	6	9
Déviation polarimétrique en degrés (raie D du sodium l = 2)	en l'absence de méthanol	3,4	2,8	2,5	2,33	2,06	I,76
	en présence de méthanol	3,26	3,06	3,0	2,83	2,66	2,66
Pouvoir réducteur exprimé en mg de glucose dans la totalité du mélange réactionnel	en l'absence de méthanol	I7I	2I7	243	259	288	309
	en présence de méthanol	I7I	I92	207	220	226	233

On peut envisager, pour le méthanol, trois modes d'action différents, susceptibles d'ailleurs d'intervenir simultanément.

1°) Inactivation progressive de l'α-galactosidase, quand la concentration du méthanol dépasse 20 p. IOO.

2°) Transfert sur le méthanol du galactose libéré avec formation d'α-méthyl D-galactoside dextrogyre et non réducteur.

3°) Synthèse par réversibilité d'action de cet α-méthyl-D-galactoside à partir du galactose libéré du mélibiose.

L'évolution du pouvoir réducteur n'est pas en faveur de la formation de β-méthylglucoside ou de β-méthylgalactoside, nettement lévogyres. La formation d'α-méthylglucoside paraît douteuse, elle aussi. Nous avons constaté en effet que la préparation enzymatique du Café utilisée pour ces essais est dépourvue d'α-glucosidase; elle est sans action sur l'α-méthyl-D-glucoside, le saccharose et l'acide maltobionique; elle ne manifeste qu'une action hydrolysante très minime sur le β-méthyl-D-glucoside; elle hydrolyse lentement le lactose, mais n'agit pas sur un autre β-galactoside, l'acide lactobionique.

Par contre, elle a hydrolysé tous les α-galactosides qui lui ont été opposés : mélibiose, acide mélibionique, manninotriose, acide manninotrionique, raffinose et stachyose.

Ces divers faits nous ont conduit à tenter d'identifier le méthyl-α-D-galactoside.

2°) Identification de l'α-méthyl-D-galactoside.

Nous avons réalisé cette identification :

a) en dosant le méthanol libérable par hydrolyse :

Si l'on admet que la différence de pouvoir réducteur des essais avec et sans méthanol correspond sensiblement au galactose combiné sous forme de méthyl-galactoside, nous pouvons calculer qu'après 3 jours il s'est formé 42 mg de méthylgalactoside et 67 mg après 6 jours. Or le dosage du méthanol libéré par hydrolyse acide indique la formation de 36,5 mg et de 6I mg de méthylgalactoside après 3 jours et après 6 jours respectivement. Ces chiffres sont du même ordre de grandeur que les chiffres calculés, résultat assez satisfaisant, compte tenu de l'imprécision d'un calcul basé sur la différence des pouvoirs réducteurs de mélanges complexes.

b) en utilisant la technique chromatographique :

Au cours de l'hydrolyse en milieu méthanolique, il apparaît progressivement un corps migrant exactement comme l'α-méthyl-D-galactoside témoin. L'addition de ce dernier au mélange réactionnel intensifie la tache observée. Le spot de l'α-méthylgalactoside est nettement distinct de ceux du mélibiose, du galactose et du glucose.

c) en réalisant l'isolement du méthylgalactoside :

L'opération est effectuée à partir de doses de réactifs 40 fois plus grandes que celles que nous avons utilisées précédemment pour l'essai en présence de méthanol; après 9 jours de contact à 37° les 1000 ml de mélange réactionnel sont

neutralisés par addition de 2 g de carbonate de calcium. Nous portons à l'ébullition pour inactiver l'enzyme et nous concentrons par distillation sous vide jusqu'à obtention d'un résidu sirupeux; ce dernier est épuisé par 200 ml d'acétate d'éthyle légèrement hydraté en opérant à l'ébullition sous réfrigérant. Après repos de 24 h, nous décantons le liquide surnageant que nous concentrons jusqu'à début d'opalescence par distillation sous vide; nous ajoutons alors un volume égal d'éther et nous abandonnons au repos pendant une semaine à la température du laboratoire. Nous recueillons 20 mg de cristaux blancs dont le point de fusion au bloc Maquenne est égal à 95°; les points de fusion des deux échantillons distincts d'α-méthyl-D-galactoside obtenus par voie chimique sont respectivement de 94° et 93°. Le corps obtenu migre par chromatographie sur papier comme les deux échantillons témoins. Il libère, par hydrolyse chlorhydrique, des sucres réducteurs et fournit un diagramme de diffraction aux rayons X identique à celui de l'α-méthyl-D-galactoside obtenu par synthèse chimique et recristallisé dans les mêmes conditions (Tableau XI).

TABLEAU XI : Diagramme de diffraction aux rayons X de l'α-méthyl-D-galactoside.

d en A	Intensité relative des bandes
I0,69	intense
7,07	intense
6,I3	intense
5,3I	très intense
5,I3	très intense
4,62	très intense
4,33	intense
3,94	intense
3,68	moyen
3,53	très intense
3,3I	faible
3,I9	très intense
3,06	moyen
2,9I	moyen
2,8I	moyen
2,7I	moyen
2,64	faible
2,55	moyen
2,49	faible
2,43	faible
2,35	moyen
2,3I	très intense
2,20	moyen
2,II	moyen

3°) Action synthétisante et action transférante sur le méthanol de l'α-galactosidase.

Après avoir caractérisé l'α-méthylgalactoside formé, nous avons recherché s'il résultait d'un transfert ou de la combinaison au méthanol du galactose libéré. Nous avons donc suivi l'action de la galactosidase sur un mélange de méthanol et de galactose; nous utilisons les réactifs dans les mêmes proportions que pour l'étude de l'hydrolyse du mélibiose en milieu méthanolique, mais en substituant à la solution de mélibiose 10 ml d'une solution M/10 de galactose, c'est-à-dire une concentration en galactose égale à celle qui serait atteinte après hydrolyse totale du mélibiose.

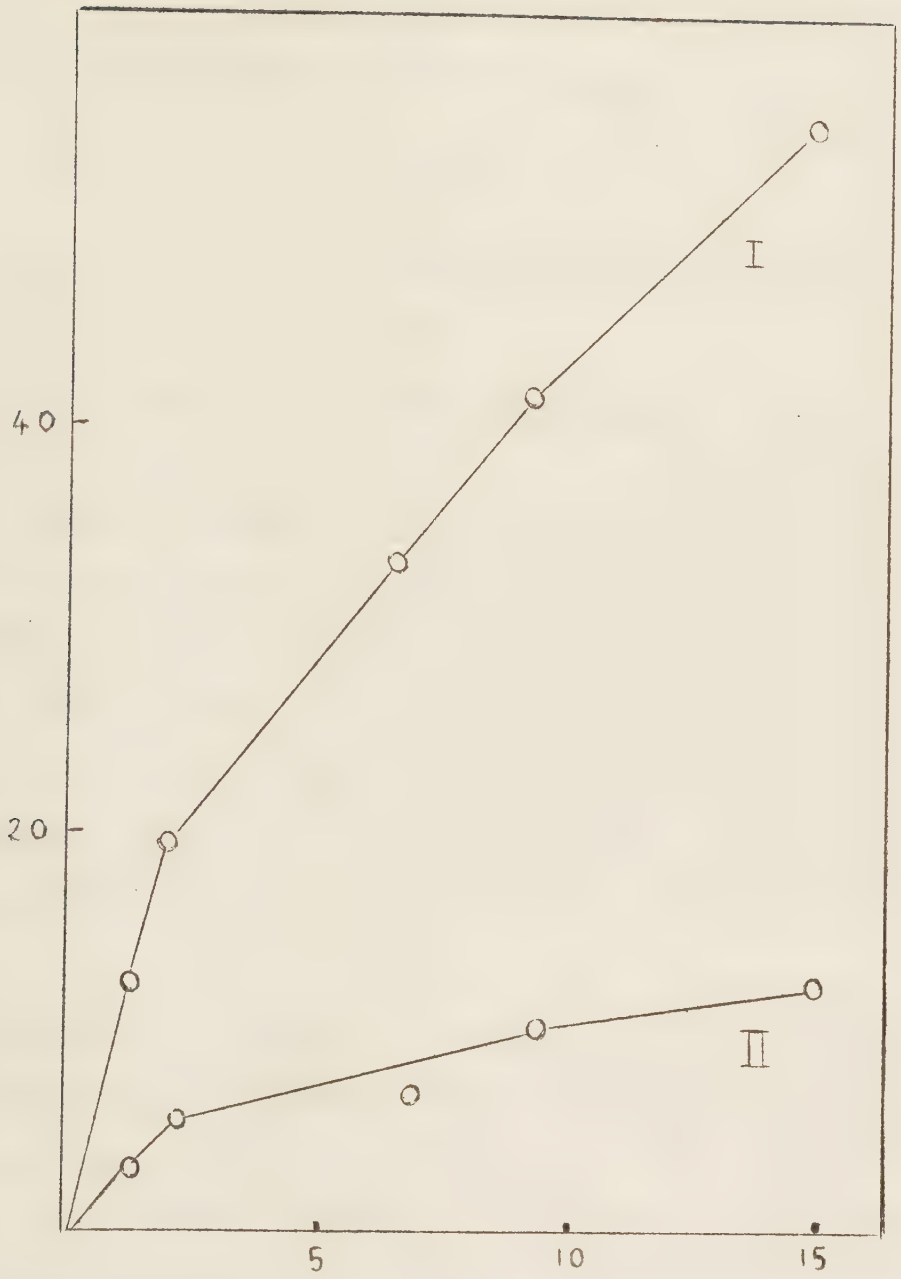
La figure 1 représente les vitesses comparées de la formation du méthyl-galactoside à partir du mélibiose et à partir du galactose. Comme l'avait observé J. RABATÉ (92) avec la β-glucosidase, la réaction de transfert est beaucoup plus rapide que la synthèse directe et permet la formation d'une plus forte proportion de méthylhexoside.

La vitesse de synthèse enzymatique directe des osides est proportionnelle à la concentration de l'ose qui se combine, l'écart entre les vitesses de transfert et de synthèse directe est donc encore plus accentué qu'il ne ressort de l'examen de la courbe 1; en effet, pour la synthèse par réversibilité, le galactose libéré progressivement du mélibiose se trouve à une concentration inférieure à celle du galactose présent initialement dans le milieu au cours de l'essai de synthèse directe.

CONCLUSION

Le méthanol est un accepteur très précieux pour l'étude des réactions de transfert; en effet, les hétérosides du méthanol ne sont que très lentement dédoublés par les glucidases; si donc ils prennent naissance au cours d'une réaction de transfert, ils ne seront scindés qu'assez lentement par les enzymes présents et seront ainsi plus facilement décelables dans le milieu réactionnel.

L'α-galactosidase des graines de Café peut transférer, sur le méthanol, le galactose du mélibiose; l'α-méthyl-D-galactoside formé a pu être isolé et identifié. Le raffinose et le stachyose peuvent eux aussi agir comme donateurs d'α-galactose dans des réactions de transgalactosylation. Au cours de ces réactions, il se forme des homologues supérieurs qui migrent, par chromatographie, comme le verbascose et l'ajugose.



g. 1 : Formation de l'α méthyl-D-galactoside en fonction du temps :
I, par transfert à partir du mélibiose; II, par synthèse directe
à partir du galactose.

En abscisses : durée de la réaction en jours.
En ordonnées : pourcentage du galactose initialement présent
(libre ou sous forme de mélibiose) retrouvé à l'état d'α méthyl-
galactoside.

CHAPITRE II

OBTENTION DU RAFFINOSE

INTRODUCTION

Nous avons montré que l'α-galactosidase du Café pouvait provoquer le transfert de l'unité α-D-galactopyranosyl du mélibiose agissant comme donateur sur quelques accepteurs hydroxylés (Chapitre I). Parallèlement à nos recherches FRENCH (52) confirma les résultats préliminaires de BLANCHARD et ALBON (13); il signala que l'α-galactosidase de la levure de brasserie avait des propriétés transférantes; réagissant sur le mélibiose, elle conduit à la formation de manninotriose; ce digalactosidoglucose put être réduit en manninotritol, isolé et identifié.

Nous avons poursuivi nos recherches sur les propriétés transférantes de la galactosidase du Café, en utilisant différents donateurs et accepteurs. Nous avons eu recours tout d'abord au phényl-α-D-galactoside donateur; ce corps, relativement facile à synthétiser, est rapidement hydrolysé par l'enzyme. Il importe de remarquer que les osides facilement hydrolysables sont généralement de bons donateurs, les corps formés par transfert étant ensuite attaqués plus lentement par l'enzyme.

L'expérience nous ayant montré que le phényl-α-D-galactoside, en particulier, était un bon donateur de galactose, nous avons tenté de délimiter la spécificité des accepteurs.

Dans ce chapître, nous donnons les résultats obtenus avec toute une gamme d'oses, osides et corps apparentés. Dans le cas du saccharose accepteur, le corps formé par transfert a pu être isolé et identifié au raffinose.

PARTIE EXPERIMENTALE

A) Donateur. Le phényl-α-D-galactoside a été préparé selon la méthode de HELFERICH et SCHMIDT-HILLEBRECHT (60).

B) Accepteurs. Le gentiobiose, le gentianose, les méthyl-glucosides α et β, le méthyl-α-mannoside et l'amygdaloside proviennent de la collection de glucides du Professeur HERISSEY. Le L-xylose a été préparé selon la technique de COURTOIS et LE DIZET (32), après oxydation par l'acide periodique de l'o-benzylidène sorbitol. Les autres oses, osides ou polyols utilisés sont des échantillons commerciaux; leur homogénéité a été contrôlée par chromatographie sur papier. Certains renfermaient des impuretés glucidiques (galactose, lactose, mannose); ils ont été purifiés par recristallisation dans l'éthanol à différents titres jusqu'à obtention d'échantillons chromatographiquement homogènes.

C) Enzymes. Comme dans les expériences précédentes, nous avons eu recours à une préparation obtenue à partir des graines de Café (sorte Bahia) selon la méthode d'HELFERICH et VORSATZ (58) : précipitation de l'enzyme par le tanin, éliminé ensuite par lavages à l'acétone.

D) Protocole des essais. Dans un tube à essais stérile bouché, nous introduisons tout d'abord 2 ml de solution 0,1 M d'α-phényl-D-galactoside et 2 ml de solution d'accepteur; ce dernier est employé à diverses concentrations comprises entre 0,5 M et 5 M selon sa solubilité; dans les cas de la glucosamine et du glycérophosphate, la solution est ajustée à pH 5,0. Nous ajoutons alors 0,5 ml du tampon acide acétique 0,5 M-soude de pH 5,0 et 0,5 ml de solution d'enzyme à 2 p. 100.

Nous procédons à trois prélèvements au moins après des durées variables d'incubation à + 37°C; selon la vitesse de la réaction, ces prélèvements ont lieu après 6, I2, 24 ou 48 heures.

Les corps libérés par hydrolyse ou synthétisés par transfert sont alors recherchés par chromatographie sur papier.

E) Identification par chromatographie des corps formés.

1) Développement : nous avons utilisé le plus souvent le solvant I; le développement s'effectue à la température du laboratoire, en chromatographie descendante, pendant 1 ou 2 jours, sur papier Whatman n°1 ou 4.

Dans le cas particulier de l'α-glycérophosphate comme accepteur éventuel, nous développons avec le solvant IV.

2) Révélation : après séchage du chromatogramme dans un courant d'air, nous révélons par l'une ou l'autre des deux techniques :

a) Pulvérisation d'une solution à 1 p. I00 de tétraacétate de plomb dans l'éthanol absolu préparée immédiatement avant l'emploi.

b) Pulvérisation du révélateur à la β-naphtylamine et au thymol.

Dans les conditions opératoires que nous venons de décrire, les divers glucides se séparent assez bien. Après 24 h de développement par chromatographie descendante, à 22°, en utilisant le papier Whatman n°1 et le solvant isopropanol 7, n-butanol 1, eau distillée 2, les accepteurs s'étagent avec des R_F moyens suivants :

Stachyose	0,03
Raffinose	0,09
Gentianose	0,10
Gentiobiose	0,I2
Lactose	0,I2
Cellobiose	0,I5
Maltose	0,I6
Tréhalose	0,I9
D-glucosamine	0,23
Saccharose	0,24
D-galactose	0,26

D-glucose	0,30
L-Sorbose	0,31
D-fructose	0,32
D-mannitol (	
D-mannose (	0,34
L-arabinose (	
D- ou L-xylose	0,37
α-méthyl-D-galactoside	0,40
D-ribose	0,43
β-méthyl-D-glucoside	0,44
α-méthyl-D-glucoside	0,45
L-rhamnose	0,46
α-méthyl-D-mannoside	0,52
glycérol	0,57
α-phényl-D-galactoside	0,65

Le phénylgalactoside donateur est donc plus mobile que tous les accepteurs utilisés; lorsque nous avons pu déceler un transfert d'α-galactose sur un ose ou un oside, le corps synthétisé avait un R_F inférieur à la fois à celui du donateur et à celui de l'accepteur.

RESULTATS

Nous envisageons tout d'abord le cas des corps qui n'ont jamais permis de déceler le moindre spot de galactoside synthétisé par transfert; nous discuterons ensuite les résultats fournis par les corps qui se sont révélés comme étant de bons accepteurs.

Corps n'ayant pas réagi comme accepteurs

a) Polyols : Aucun transfert n'a pu être observé sur les deux polyols acycliques, glycérol et mannitol, non plus que sur le cyclitol étudié, le mésoinositol. Déjà avec le mélibiose comme donateur (2), nous n'avions pu obtenir de transfert sur le glycérol ou sur le mésoinositol. Dans le cas du glycérol, nous avons vérifié que le floridoside (α-D-galactoside de la fonction alcool secondaire du glycérol) pouvait aisément être caractérisé par chromatographie, en l'adjoignant comme témoin interne aux mélanges réactionnels résultant des tentatives de transfert sur le glycérol.

Tous les essais réalisés en utilisant comme accepteur l'acide α-glycérophosphorique se révélèrent infructueux. Ce résultat négatif semble infirmer l'hypothèse de BEAN et HASSID (10) qui considéraient le galactoside de l'α-glycérophosphate comme intermédiaire possible de la synthèse du floridoside chez les Algues.

b) Pentoses : Les résultats ont été négatifs avec tous les pentoses étudiés D-ribose, L-arabinose, D-xylose, L-xylose ainsi qu'avec un méthylpentose : le L-rhamnose.

c) Cétohexoses : le D-fructose et le L-sorbose n'ont pas permis de déceler de transfert.

d) Il en a été de même avec la glucosamine et les divers hétérosides utilisés : α et β méthyl-D-glucosides, α-méthyl-D-mannoside, amygdaloside. Nous signalerons en outre que dans les essais de transfert avec le méthanol accepteur et le mélibiose ou le phénylgalactoside donateurs, nous n'avons jamais décelé de spot nouveau, autre que celui du méthyl-α-D-galactoside. Ce dernier ne paraît pas avoir fonctionné comme accepteur de molécules supplémentaires de galactose, du moins aux faibles concentrations où le méthyl-galactoside avait été synthétisé dans le milieu.

Accepteurs d'α-galactose

Les résultats obtenus forment la matière du tableau XII.

TABLEAU XII : Transfert d'α-D-galactose sur divers accepteurs. Donateur : α-phénylgalactoside 0,04 M dans le milieu; accepteur 2 M dans le milieu. Le nombre de signes + traduit l'intensité des spots.

Accepteurs	Durée de la réaction à 37°C			
	6 h	I2 h	24 h	48 h
méthanol	++	+++	++	
D-galactose	++	+++	++	
D-glucose	++	+++	+++	++
D-mannose	++	+++	++++	++
lactose	+	++	++	
maltose	++	++	+++	+++
cellobiose	++	++	+++	+++
gentiobiose	+	++	++	++
saccharose	++	+++	++++	+++
gentianose	+	+	++	++

Nous pouvons constater en premier lieu que le méthanol est un très bon accepteur, comme nous l'avions déjà observé avec le mélibiose comme donateur (2). En outre, nous obtenons des transferts sur les 3 aldohexoses expérimentés : galactose, glucose et mannose, les 3 diholosides réducteurs 1— 4 (lactose, maltose, cellobiose), le diholoside réducteur 1→ 6 ((gentiobiose) et enfin sur deux holosides non réducteurs, le saccharose et le gentianose (β-glucosyl (1→ 6) α-glucosyl (1↔2)fructoside).

Etude du corps obtenu par transfert sur le saccharose

L'isolement de ce corps nous a permis de montrer que le reste α-galacto-pyranosyl est uni à la fonction alcool primaire de la fraction glucose du

saccharose : il se forme du raffinose, substance assez largement répandue chez les végétaux. Nous n'avons pu déceler la formation d'un autre triholoside naturel, tel que le plantéose. Le plantéose a été découvert par MATTIEZ et HANS (105) dans les graines du genre Plantago. FRENCH (52) (53) a pu le caractériser et l'isoler à partir d'autres espèces végétales. Le plantéose résulte de l'union de l'α-galactopyranose à la fonction alcool primaire en 6 de la fraction fructose du saccharose (FRENCH, WILD, YOUNG et JAMES (55)).

Par ailleurs, dans les recherches en cours, nous avons étudié le mélange complexe résultant de l'action de l'α-galactosidase du Café sur une solution concentrée de raffinose.

Nous avons pu y détecter, par chromatographie sur papier, un premier holoside migrant comme le stachyose et un second, non hydrolysable par la sucrase, et se déplaçant comme le plantéose.

Isolement. - Nous mettons en contact pendant 24 h à 37°C :

20 ml d'α-phényl-galactoside 0,1 M

20 ml de saccharose 2 M totalement exempt de raffinose

5 ml de tampon acide acétique - soude de pH 5,0

5 ml de solution de galactosidase du Café à 2 p. 100

Le milieu est ensuite neutralisé, porté 2 minutes à l'ébullition pour inactiver les enzymes présents, concentré par évaporation sous vide en présence d'anhydride phosphorique. Les glucides sont alors fractionnés par passage sur colonne selon la méthode de WHISTLER et DURSO (111); le résidu sirupeux est introduit sur une colonne de 23 cm de hauteur et 3,5 cm de diamètre constituée par un mélange à parties égales de charbon activé VS20 des établissements Pica et de celite Hypo-Super-Cel (Johns Manville Co, USA).

Nous éluons successivement par l'eau distillée qui entraîne le phényl-galactoside n'ayant pas été scindé, puis par l'éthanol à 7 p. 100 qui extrait

le saccharose non transformé; finalement, l'éthanol à I5 p. I00 élue le corps synthétisé.

Les différentes fractions collectées sont analysées par chromatographie sur papier; la dernière (200 ml) est concentrée à 1 ml par distillation sous vide et additionnée de 20 ml de n-butanol; après une semaine de repos à la température du laboratoire, 30 mg de cristaux blancs se sont déposés.

Identification du raffinose

a) Le corps obtenu est homogène par chromatographie sur papier et migre comme un échantillon témoin de raffinose.

b) Nous avons soumis à l'oxydation periodique en milieu aqueux des quantités égales du corps isolé et de raffinose, les deux échantillons ayant été desséchés sous vide phosphorique, puis à I00°C, jusqu'à poids constant.

COURTOIS et WICKSTRÖM (40) ont montré qu'une molécule de raffinose réduisait cinq molécules d'acide periodique pour donner naissance à un hexaldéhyde et à deux molécules d'acide formique.

Après 48 h à la glacière et à l'obscurité, la quantité d'acide periodique réduit, exprimée en molécules par rapport à une molécule de raffinose est de 4,95 avec le témoin comme avec le corps à doser. Par suite de l'emploi de faibles prises d'essai, la libération de l'acide formique conduit à des résultats un peu moins satisfaisants : I,70 molécules d'acide monovalent rapportées à une molécule de raffinose pour le corps à doser et I,66 molécules avec le raffinose témoin.

Les résultats obtenus montrent que parmi les divers galactosides du saccharose susceptibles de se former dans les conditions indiquées, le galactose est relié à l'une des trois fonctions alcool primaire libres du saccharose. En effet, FRENCH et coll. (55) ont montré que le planteose réduisait cinq

molécules d'acide periodique pour libérer deux molécules d'acide formique.

c) La fructosidase de levure libère le fructose situé à l'extrémité de la molécule du raffinose; elle demeure sans action sur le plantéose où le fructose est substitué en 6 par un reste α-galactopyranosyl.

Nous avons soumis le corps isolé à une fructosidase purifiée selon la technique de SUMNER et SOMERS (99) (p.192). Le spot initial disparaît et nous obtenons deux corps migrant respectivement comme le mélibiose et le fructose; un échantillon témoin de raffinose s'est comporté d'une façon identique; par contre, le plantéose témoin n'a pas été hydrolysé et a été retrouvé intact par chromatographie.

d) Le diagramme de diffraction aux rayons X est exactement le même que celui d'un échantillon de raffinose témoin recristallisé dans les mêmes conditions (COURTOIS, ANAGNOSTOPOULOS et VETEK (27)). Le plantéose a fourni un diagramme différent comme l'avait déjà montré FRENCH (53).

Il résulte de l'ensemble de nos résultats que le corps synthétisé par transfert est bien le raffinose obtenu ainsi, pour la première fois à l'état pur, par synthèse biochimique. Le corps séparé par PLOCOVESCHENSKI (I2) après action de l'émulsine d'amandes sur un mélange de galactose et saccharose n'a pas été identifié avec certitude au raffinose (FRENCH (52)).

DISCUSSION

L'ensemble des résultats que nous venons d'exposer semble assez cohérent pour qu'on puisse tirer quelques indications précises sur la spécificité de l'action transférante de l'α-galactosidase du Café. En premier lieu cette spécificité paraît moins étendue que celle de la β-glucosidase de l'émulsine d'amandes.

COURTOIS et LECLERC (3I) ont observé en effet que cette dernière pouvait

transférer le β-glucose sur la plupart des composés alcooliques étudiés, alors que l'α-galactosidase du Café ne semble pouvoir transférer que sur les corps possédant une fonction alcool primaire libre. Un certain nombre de faits confirment cette spécificité.

1). En premier lieu, nous n'avons décelé aucun transfert sur les composés ne possédant pas de fonction alcool primaire : mésoinositol, rhamnose, ainsi que divers aldopentoses dans lesquels la fonction alcool primaire du carbone 5 est engagée dans l'hétérocycle pyranique.

2). L'isolement du raffinose après transfert sur le saccharose montre que, parmi les cinq fonctions alcool secondaire et les trois fonctions alcool primaire de ce diholoside, c'est la fonction alcool primaire de la fraction glucopyranose qui s'est unie au galactopyranose transféré.

3). Les divers accepteurs figurant dans le tableau XIIne paraissent avoir donné naissance, après transfert, qu'à un seul galactoside; en effet, la chromatographie sur papier n'a permis de déceler qu'un seul spot de galactoside formé. Il paraît logique d'admettre que, si les nombreuses fonctions alcool secondaire de ces accepteurs avaient pu être galactosidifiées, nous nous serions trouvé en présence d'un mélange d'isomères séparables par chromatographie sur papier. C'est en effet de qu'on observe après action transférante de l'α-glucosidase et de la β-galactosidase sur des hexoses et diholosides : BARKER et BOURNE (7), BOURNE (I4), HELLENFELS (I04), BAROJA, VENKATARAMAN et GIRI (95).

La présence d'une fonction alcool secondaire libre ne suffit donc pas pour que le corps puisse jouer le rôle d'accepteur. Nous n'avons observé aucun transfert sur les deux cétohexoses et sur les hétérosides, non plus que sur la glucosamine et l'α-glycérophosphate; pour ces deux derniers corps, l'existence de groupements polaires peut entraver l'action transférante sur une fonction alcool primaire au voisinage de ces groupements.

Les deux polyols acycliques, glycérol et mannitol, n'ont donné lieu à aucu transfert; il est bien connu que dans ces polyols, les fonctions alcool primair ont une rigidité moins grande que lorsqu'elles sont reliées à un cycle pyraniqu c'est ce qui se dégage des modalités de leur oxydation par l'acide periodique (FLEURY, COURTOIS et BIEDER (50) (51)).

L'absence de transfert sur les hétérosides à cycle pyranique stabilisé ne permet pas de retenir cette interprétation.

Une fonction pseudo-aldéhydique libre dans une molécule paraît favoriser la galactosidification d'une fonction alcool primaire dans la même molécule; tous les corps de ce type, galactose, glucose, mannose, lactose, maltose, cellobiose, gentiobiose se sont révélés comme de bons accepteurs vis-à-vis du phénylgalactoside donateur; de même, pour le glucose et le mélibiose accepteurs en utilisant le raffinose comme donateur (2).

Par ailleurs, le tréhalose et les hétérosides n'ont pas permis d'observer de transferts.

En dehors des aldoses, nous n'avons décelé de transfert que sur le saccharose et sur son β-glucoside, le gentianose. Dans l'état actuel de nos recherche le saccharose paraît être un accepteur assez spécifique d'α-galactose. En vertu de la loi d'action de masse, le pourcentage d'ose transféré augmente avec la teneur en accepteur, du moins au-dessous des limites où une forte concentration de l'accepteur inhibe l'enzyme. Nous avons pu déceler des transferts d'α-galactose sur le saccharose avec de faibles concentrations de cet accepteur (jusqu'à 0,025 M dans le milieu), concentration très inférieure à celles qu'il faut utiliser pour les autres accepteurs, lorsqu'on désire obtenir un transfert décelable avec netteté par l'analyse chromatographique.

Le rôle d'accepteur assez spécifique du saccharose ne saurait surprendre; les dérivés de l'α-galactose les plus répandus dans les végétaux sont en effet

des α-galactosides du saccharose : mono- (raffinose et plantéose), di- (stachyose) et moins fréquemment trigalactosidosaccharose (verbascose) et homologues supérieurs (FRENCH (52); HÉRISSEY, FLEURY, WICKSTRÖM, COURTOIS, LE DIZET (64)).

Cependant, parmi les rares α-galactosides naturels, figurent aussi ceux du glycérol (floridoside) et du mésoinositol (galactinol).

Jusqu'alors, nous n'avons pas réussi à transférer sur ces deux polyols le galactose provenant soit du phénylgalactoside, soit du mélibiose donateurs.

WHISTLER et ses collaborateurs (II2) (II3) (I9) ont pu séparer et identifier des α-galactosides du mannose et du mannobiose parmi les produits intermédiaires de l'hydrolyse des galactomannanes. Nous pouvons rapprocher ces résultats du fait que le D-mannose s'est révélé comme un bon accepteur de galactose (tableau XII).

Dans l'état actuel de nos connaissances, il semble prématuré d'envisager les α-galactosides du saccharose et du mannose comme résultant de transferts, alors que ceux du glycérol et du mésoinositol auraient une origine biochimique différente.

Un seul fait serait à l'appui d'une telle hypothèse : BEAN et HASSID (10) ont présenté des résultats tendant à indiquer que le floridoside résulterait d'un processus totalement différent d'un transfert de galactose par une α-galactosidase.

Le floridoside représente la principale substance glucidique de diverses algues; il se formerait, par hydrolyse phosphatasique, du galactoside de l'α-glycérophosphate, composé intermédiaire résultant de l'action de l'uridine-diphosphogalactose donateur de galactose sur l'α-glycérophosphate accepteur.

CHAPITRE III

OBTENTION D'EPIMELIBIOSE

INTRODUCTION

Dans le chapitre précédent, nous avons mis en évidence l'action transférante de l'α-galactosidase des graines de Café. L'enzyme peut transférer le groupement α-galactopyranosyl du phényl-α-D-galactoside donateur sur divers aldohexoses et disaccharides. Un certain nombre d'oses, en particulier les pentoses, les méthyl-pentoses et les cétohexoses n'ont pas permis d'observer le moindre transfert sur leur molécule.

La comparaison des chromatogrammes indique que le saccharose et le mannose ont fourni une plus forte proportion de corps synthétisés par transfert que la plupart des autres oses ou osides accepteurs.

Le transfert sur saccharose conduit au raffinose, qui a été isolé et identifié; l'α-galactose s'est donc combiné sélectivement à la fonction alcool primaire du groupement α-glucopyranosyl.

Au cours de recherches réalisées dans notre laboratoire, ARNAUD (4) a également observé que l'α-galactosidase du Café transférait assez sélectivement sur les corps possédant au moins une fonction alcool primaire α.

Nous avons pu isoler le corps formé par transfert avec l'α-phénylgalactoside donateur et le mannose accepteur. Le corps obtenu a été identifié à l'épimélibiose (I) α-D-galactopyranosyl (1→ 6)D-mannopyranose. L'épimélibiose a été

décrit pour la première fois par WHISTLER et DURSO (II2). Ces auteurs l'isolèrent des produits d'hydrolyse partielle de la guarane, galactomannane de l'endosperme des graines de guar. HOUGH-JONES et RICHARDS (73) ont également obtenu de l'épimélibiose à partir du mélange complexe résultant de l'action de l'ammoniaque concentrée sur le mélibiose.

L'α-galactosidase a donc transféré préférentiellement le groupement α-D-galactopyranosyl sur la fonction alcool primaire du D-mannopyranose, c'est-à-dire sur celle qui est située en dehors du cycle. C'est d'ailleurs cette fonction alcool primaire des aldohexoses qui se montre la plus sélective avec les agents chimiques, ainsi qu'il ressort des résultats rassemblés dans la revue générale de SUGIHARA (98) et de ceux, plus récents, obtenus dans le laboratoire de E. LEDERER lors de l'estérification du tréhalose par les acides gras (5) (89).

PARTIE EXPERIMENTALE

1) Réaction de transfert.

Dans un flacon stérile de 60 ml, nous mettons en contact 20 ml de solution 0,1 M d'α-phényl-D-galactoside préparé selon la méthode d'HELFERICH et SCHLITZ-HILLEBRECHT (60), 20 ml de solution 2,5 M de D-mannose, 5 ml de tampon acide acétique - soude de pH 5,0 et 5 ml de suspension à 2 p. 100 de préparation enzymatique des graines de café. Cet enzyme a été préparé selon le protocole opératoire d'HELFERICH et VOLSATZ (58) : précipitation par le tanin, éliminé ensuite par lavages à l'acétone. Après contact de 24 h à 37°, nous neutralisons, nous portons à l'ébullition pour inactiver l'enzyme et nous centrifugeons afin d'éliminer le précipité formé; le liquide surnageant est concentré sous vide jusqu'à obtention d'un résidu sirupeux.

2) Fractionnement des produits de la réaction.

La chromatographie sur papier du produit réactionnel indique la présence

d'une petite quantité d'α-phénylgalactoside non transformé, d'une quantité importante de mannose, d'une bien plus faible proportion de galactose libéré par hydrolyse et d'une fraction moins grande encore d'un corps migrant comme un disaccharide et dont le R_F est assez proche de celui du mélibiose.

Ces divers produits ont été séparés par fractionnement sur une colonne de charbon en utilisant le dispositif suivant : une colonne en verre de 60 cm de hauteur et 3 cm de diamètre est obturée à sa partie supérieure par un bouchon donnant passage à un tube vertical en verre relié à la partie inférieure d'une ampoule à décantation contenant le solvant d'élution. Nous introduisons dans la colonne, sur une hauteur d'environ 30 cm, du charbon Pica V.S.20 soumis à la préparation suivante : 300 g de charbon sont délayés dans un litre de ClH 2N et maintenus 30 minutes sur un bain-marie bouillant. Après refroidissement, nous lavons sur un filtre de Büchner avec de l'eau distillée jusqu'à disparition de l'anion Cl^- puis nous desséchons pendant 24 h à 100°.

La solution sirupeuse renfermant les glucides à fractionner est versée à la partie supérieure de la colonne et on élue par l'eau distillée stérile. L'α-phénylgalactoside non transformé sort avec les premiers effluents puis viennent le mannose et le galactose associés.

Lorsque les essais de chromatographie sur papier indiquent que ces deux aldohexoses ont été extraits, ce qui a nécessité l'emploi de 10 litres d'eau, le disaccharide est élué par l'éthanol à 5 p. 100; 7 litres d'alcool dilué ont dû être utilisés pour réaliser une extraction complète.

La solution est évaporée à sec par distillation sous vide. Le résidu est repris par 2 ml d'eau bouillante et purifié par passage sur une colonne de charbon de 15 cm de hauteur et 1 cm de diamètre. L'élution est réalisée par une solution d'éthanol à 5 p. 100. Les éluats sont concentrés jusqu'à obtention d'un résidu légèrement sirupeux. Le cristallisoir contenant ce résidu

est placé sous une cloche avec un Bécher rempli d'alcool absolu.

Dans cette atmosphère saturée de vapeurs d'éthanol, le disaccharide cristallise lentement.

Les cristaux sont recueillis après une semaine et lavés par l'alcool absolu. Après trois expériences analogues à celle que nous venons de décrire, nous avons pu rassembler 250 mg d'un corps se présentant sous forme de cristaux, légèrement jaunâtres, d'apparence cubique.

3) Propriétés physiques.

Les cristaux obtenus perdent 5,I5 p. I00 d'eau par dessiccation à I00° jusqu'à poids constant. Il s'agit donc vraisemblablement du monohydrate $C_{12}H_{22}O_{11}$ OH_2 : perte d'eau théorique p. I00 : 5.

Avec différents mélanges solvants, le corps obtenu migre de façon homogène par chromatographie descendante sur papier, il est un peu plus mobile que le mélibiose; on obtient les résultats suivants :

a) avec le solvant n-butanol 4 vol./éthanol absolu 4 vol./eau 2 vol.

mélibiose R_F 0,I03

corps isolé (EM)[1] R_F 0,I3I

saccharose R_F 0,I80

b) avec le solvant isopropanol 7 vol./n-butanol 1 vol./eau 2 vol.

les R_F sont respectivement :

mélibiose 0,I56

EM 0,I85

saccharose 0,282

---

(1) Pour la commodité de l'exposé, nous représenterons par EM le corps isolé des produits de la réaction de transfert et que nous avons identifié à l'épimélibiose.

Le corps hydraté commence à fondre à I50° au tube, EM desséché : P.F. I76-I78° au tube, I9I° au bloc Maquenne.

Ce point de fusion est inférieur à ceux indiqués par WHISTLER et DURSO (II2) : 20I-20I°,5 et par HOUGH-JONES et RICHARDS (73) : I97°.

L'écart est encore plus accentué pour le pouvoir rotatoire; au lieu des chiffres indiqués par ces auteurs, + I24°6 (II2) et + I27°3 (73) nous avons trouvé pour EM en solution aqueuse un pouvoir rotatoire $(\alpha)_D^{20}$ = + I04°5 (A = + 3°5 ; l = 1 ; c = 3,343 p. I00).

La mutarotation s'effectue vers la droite comme pour les deux autres échantillons d'épimélibiose (II2) (73), ce qui indique qu'il a cristallisé sous sa forme β.

Les faibles quantités de EM dont nous disposions ne permettaient pas de le purifier par recristallisation de façon à obtenir un échantillon ayant le point de fusion et le pouvoir rotatoire des épimélibioses antérieurement décrit (II2) (73). Nous avons dû en réaliser l'identification par des méthodes chimiques.

4) Propriétés chimiques.

Elles ont été comparées à celles du disaccharide le plus proche, le mélibiose : α-D-galactopyranosyl (1→ 6)-D-glucopyranose.

a) pouvoir réducteur : il a été apprécié vis-à-vis du réactif cupro-alcalin, selon la technique de NELSON (83) modifiée par SOMOGYI (97).

I67,4 µg d'EM ont le même pouvoir réducteur que 87 µg de glucose, alors que I68,2 µg de mélibiose correspondent à 95 µg de glucose. Par rapport à une quantité équimoléculaire de glucose prise comme unité, les réductions par l'EM par le mélibiose sont respectivement égales à 0,98 et à I,07.

Après hydrolyse acide de II3,5 µg d'EM, le pouvoir réducteur s'élève à une valeur correspondant à II0 µg d'un mélange équimoléculaire de galactose

et de mannose (théorie : II9,4). L'hydrolyse de II8 µg de mélibiose conduit à une réduction correspondant à I20 µg d'un mélange équimoléculaire de galactose et glucose (théorie I24 µg).

EM et le mélibiose ont donc des pouvoirs réducteurs assez proches; il en est de même pour leurs produits d'hydrolyse.

b) dosage des hexoses libérés par hydrolyse acide.

I6,74 mg d'EM sont dissous dans 1 ml d'acide sulfurique 0,5 N; l'ampoule scellée renfermant la solution est plongée pendant 3 heures dans un bain-marie bouillant. Après refroidissement, on neutralise par le carbonate de baryum, on centrifuge et on soumet l'hydrolysat à une chromatographie descendante sur papier Whatman n° 1. Les essais préliminaires n'ont pas permis de déceler d'autres corps que le galactose et le mannose. Un volume d'hydrolysat correspondant à I67,4 µg de EM est réparti sur le chromatogramme à l'aide d'une micropipette, à des intervalles équidistants sur la partie centrale de la ligne de départ. Aux deux extrémités de cette ligne, on dépose une solution témoin contenant des quantités de galactose et de mannose égales chacune à 80,1 µg.

Après 2 jours de développement par le mélange : n-butanol, 4 vol./éthanol absolu, 1 vol./eau, 1 vol., le papier est séché et les deux bandes longitudinales extrêmes correspondant à la solution témoin sont révélées, de manière à localiser l'emplacement des deux hexoses sur le chromatogramme. On découpe alors dans la partie centrale de celui-ci, correspondant à l'échantillon étudié, les deux bandes horizontales situées respectivement aux niveaux du galactose et du mannose témoins. Ces bandes sont traitées séparément par le solvant : isopropanol, I0 vol; méthanol, 5 vol.; eau, 4 vol.; chacun des deux éluats est introduit dans un tube à essai, évaporé à siccité, repris par l'eau; l'hexose est alors dosé par la méthode Nelson-Somogyi(83) (97).

Nous avons retrouvé 100 µg de galactose et 95 µg de mannose; les I67,4 µg

d'EM auraient dû libérer 88,1 µg de chacun de ces aldohexoses.

L'erreur par excès provient du fait que le papier cède toujours une faible quantité de substances réductrices dont le taux est difficile à évaluer avec certitude. Les chiffres obtenus indiquent cependant que EM a libéré des quantités sensiblement équimoléculaires de galactose et de mannose.

c) dosage des hexoses libérés par l'α-galactosidase.

IO,044 mg d'EM sont dissous dans 0,7 ml d'eau distillée contenant en suspension 4 mg d'α-galactosidase de Café, on ajoute alors 0,1 ml de tampon acide acétique-soude de pH 5,1. Des essais effectués à intervalles réguliers par chromatographie montrent qu'en 5 jours à + 37° EM est totalement hydrolysé en galactose et en mannose; ces sucres sont les seuls oses détectables sur les chromatogrammes. Une fraction de l'hydrolysat correspondant à I43,5 µg d'EM initial devrait fournir 75,5 µg de chacun des hexoses. Le dosage après séparation chromatographique selon la technique utilisée pour l'hydrolysat acide donne 8I µg de galactose et 74 µg de mannose.

L'hydrolyse par l'α-galactosidase confirme que les deux hexoses sont en quantités équimoléculaires et indique que le disaccharide est un α-D-galactosidomannose.

d) oxydation par l'acide periodique.

Elle a pour but de préciser l'emplacement de la liaison osidique sur le mannose. Nous avons étudié comparativement l'oxydation, en fonction du temps : d'EM,- d'un α-galactoside 1→ 6 : le mélibiose et d'un β-galactoside 1→ 4 : le lactose.

COURTOIS, WICKSTRÖM et LE DIZET (43) ont montré qu'une molécule de mélibiose réduit six molécules d'acide periodique, en libérant cinq molécules d'acide formique et en donnant naissance à un trialdéhyde stable, sans qu'il y ait libération de formaldéhyde.

Les mêmes auteurs (43) avaient confirmé les résultats antérieurs de COURTOIS et RAHET (39) sur l'oxydation periodique du lactose; les produits intermédiaires formés au cours des premières étapes de l'oxydation subissent une superoxydation par l'acide periodique. Une mol. de lactose fournit, après une longue durée d'oxydation : 9 mol. d'acide formique, 2 mol. de formaldéhyde et une mol. d'anhydride carbonique.

Le Tableau XIII indique les quantités d'acide periodique (solution sulfurique de periodate de sodium) réduites, au cours du temps, à la glacière et dans l'obscurité; l'excès d'acide periodique est titré par iodométrie selon la technique indirecte à l'anhydride arsénieux-iodure.

TABLEAU XIII : Réduction de l'acide periodique en fonction du temps de contact

Durée de contact (en jours)	1	2	7	I5	30
Lactose	4,32	5,25	7,22	9,50	I0,5
Mélibiose	5,74	5,79	5,89	5,89	5,89
E.M.	5,5I	5,5I	5,7I	5,82	5,87

Les résultats sont exprimés en molécules d'acide periodique réduites par molécule de disaccharide.

Dans le tableau XIV, nous donnons les résultats obtenus en titrant l'acide formique libéré au cours de l'oxydation (titrage acidimétrique après addition d'éthylène-glycol).

TABLEAU XIV : Acide formique libéré en fonction du temps par oxydation periodique

Durée de contact (en jours)	1	2	7	I5	30
Lactose	I,8	2,45	4,I8	6,75	8,02
Mélibiose	3,55	4,I6	4,I6	4,8I	4,88
E.M.	3,26	3,57	4,08	4,85	4,83

Les résultats sont exprimés en molécules d'acide monovalent libéré par molécule de disaccharide.

L'examen des deux tableaux confirme les essais antérieurs avec le mélibios et le lactose.

EM est oxydé selon des modalités presque identiques à celles du mélibiose, mais totalement différentes de celles du lactose. Il réduit six molécules d'aci de periodique en donnant naissance à 5 mol. d'acide formique. La vitesse initia le est cependant un peu plus faible pour EM que pour le mélibiose, comme on le voit aussi bien en dété rminant l'acide periodique réduit que l'acide formique libéré.

La fraction glucose du mélibiose semble être oxydée plus rapidement que la fraction mannose de l'épimélibiose. Avec les deux hexoses libres, FLEURY, COURTOIS et BIEDER (50) avaient observé au contraire que le mannose était oxydé plus rapidement que le glucose.

Après des oxydations d'une durée de 7,I5 ou 30 jours, nous avons détecté le formaldéhyde en le précipitant par le dimédon dans les produits d'oxydation du lactose.

Il n'a pas été possible de déceler la présence de formaldéhyde après oxy- dation d'EM ou de mélibiose. L'addition ultérieure de formaldéhyde à ces milieu

provoque la précipitation par le dimédon.

La cinétique de l'oxydation periodique d'EM indique donc qu'il a réagi comme un galactopyranosyl(1→6)mannose.

e) obtention de mélibiosazone.

WHISTLER et DURSO (II2) ont montré que, comme on pouvait le prévoir, l'épimélibiose fournit la même osazone que le melibiose. 34 mg d'EM sont additionnés de 0,034 ml de phénylhydrazine redistillée, 0,0I7 ml d'acide acétique glacial et I,6 ml d'eau distillée. L'ampoule scellée contenant le mélange est plongée pendant 40 minutes dans un bain-marie bouillant; aucun précipité n'apparaît, mais par refroidissement lent, il se forme des cristaux jaune clair.

Le mélibiose traité dans les mêmes conditions s'est comporté d'une façon similaire.

A partir des 34 mg d'EM utilisés, on a pu recueillir I8 mg d'un corps fondant à + I70°, en tube, comme le mélibiose témoin; le mélange des deux corps fond à + I69°.

COURTOIS, WICKSTRÖM et LE DIZET (4I) ont montré que la mélibiosazone est oxydée par l'acide periodique en donnant un précipité de 1-2-bisphényl-hydrazone du mésoxaldéhyde; I3 mg de l'osazone d'EM sont dissous dans 5 ml d'éthanol à 66 p. I00 bouillant; après refroidissement progressif à 0°, on ajoute 0,3 ml d'acide periodique N en solution aqueuse; il se forme immédiatement un précipité qu'on recueille par filtration après 10 minutes et qu'on lave avec I,5 ml d'eau distillée.

Un essai témoin avec la mélibiosazone donne des résultats identiques.

L'osazone d'EM conduit par oxydation periodique à un corps de PF I98°, la mélibiosazone à un corps de PF I98°, et le mélange de ces deux corps fond à + I98°.

COURTOIS, WICKSTRÖM et LE DIZET (4I) indiquent I97°5 à I98° comme point de

fusion pour la 1-2-bisphénylhydrazone du mésoxaldéhyde.

L'action de la phénylhydrazine sur EM conduit à la formation de mélibiosazone, ce qui prouve de façon irréfutable qu'EM peut être identifié à l'épimélibiose.

CONCLUSIONS

L'α-galactosidase des graines de Café transfère le galactose de l'α-phényl-D-galactoside sur le D-mannose. Le corps formé a été isolé, après fractionnement par élution à partir d'une colonne de charbon. Il fournit par hydrolyse acide ou enzymatique une molécule de galactose et une molécule de mannose, il est oxydé par l'acide periodique comme un disaccharide 1→ 6 et se combine à la phénylhydrazine pour donner de la mélibiosazone.

L'enzyme a donc transféré le galactose sur la fonction alcool primaire du mannose pour former l'épimélibiose (α-D-galactopyranosyl (1→ 6)-D-manno-pyranos

RESUME ET CONCLUSIONS GENERALES

Ce travail constitue une étude sur l'action tant hydrolysante que transférante des α-galactosidases.

Les questions d'ordre général sont exposées dans la première partie.

Le chapître 1 résume l'état actuel des recherches sur la répartition, la spécificité et les propriétés des α-galactosidases.

Le matériel utilisé et les techniques mises en oeuvre sont indiqués dans le chapître II. Nous avons employé comme substrats soit le mélibiose ou α-galactosido (1→6)-glucose, soit le phényl-α-D-galactoside. Comme sources d'α-galactosidases, nous avons eu recours aux graines de Café, à la taka-diastase et à une Aspergillacée, le Penicillium paxillus.

Les méthodes de chromatographie ainsi que les techniques de dosages de l'hexose et du méthanol combiné sont exposées en détail.

Les réactions d'hydrolyse par les α-galactosidases font l'objet des recherches présentées dans la deuxième partie.

L'hydrolyse par l'enzyme du Café des oligosaccharides a été tout d'abord étudiée (Chapître I).

Nous avons montré que l'hydrolyse du stachyose par l'α-galactosidase s'effectue en deux étapes : il y a tout d'abord mise en liberté d'une molécule de galactose et formation de raffinose; ce dernier est ensuite scindé en galactose et saccharose. Nous avons pu isoler et identifier le raffinose et le saccharose qui dérivent ainsi du stachyose.

Les galactosides naturels, qui sont tous des holosides, peuvent être

hydrolysés par les α-galactosidases : tels sont le raffinose, le stachyose, le verbascose, etc... L'α-galactosidase du Café détache sélectivement le galactose terminal non substitué des galactosides du saccharose ainsi que des galactosides du glucose correspondants. C'est ainsi que l'ajugose est d'abord transformé en verbascose, par perte de ce galactose, puis en stachyose, en raffinose et enfin en saccharose.

Les résultats de l'hydrolyse de la galactomannane de Luzerne par diverses préparations α-galactosidasiques sont présentés dans le chapître II.

L'α-galactosidase du Café détache les unités de galactose fixées par des liaisons (1→ 6) aux fonctions alcool primaire des molécules de mannose constituant la chaîne centrale.

L'action de la taka-diastase consiste en une libération de galactose, puis de mannose et enfin d'un disaccharide que nous avons pu isoler et identifier au β-mannosido (1→ 4) mannose. L'α-galactosidase détache donc en premier lieu les chaînes latérales de galactose tandis que la β-mannosidase libère des unités de mannose qui ne sont plus osidifiées par le galactose.

L'α-galactosidase de Penicillium paxillus a une spécificité moins étendue que celles des graines de Café et de la taka-diastase. Elle n'hydrolyse pas la galactomannane de Luzerne, mais peut agir sur le produit de l'hydrolyse partielle de ce polysaccharide par l'enzyme du Café.

L'action des α-galactosidases n'est pas limitée à l'hydrolyse des galactosides. Nous avons mis en évidence des transferts de groupements α-D-galactopyranosyl à partir d'un donateur sur un accepteur pour former de nouveaux galactosides (Troisième partie).

Les réactions catalysées par ces enzymes peuvent donc être considérées comme des réactions de transfert, l'hydrolyse n'étant, somme toute, qu'un

transfert sur l'eau.

Nous avons étudié la spécificité d'accepteurs en utilisant une gamme variée de substrats : alcools, oses, osides.

Avec le méthanol accepteur et le mélibiose donateur, nous avons pu isoler et identifier le méthyl-α-D-galactoside formé par action transférante de l'α-galactosidase du Café (Chapître I).

Dans le cas du mannose accepteur et avec le même donateur, le transfert conduit à l'épimélibiose ou α-galactosido (1→ 6) mannose.

Nous avons également démontré qu'il est possible d'obtenir le raffinose en employant le saccharose comme accepteur. Le même résultat a été obtenu ensuite par ARNAUD avec l'α-galactosidase des graines de Luzerne (4).

L'emploi du cellobiose comme accepteur conduit à l'obtention de trois galactosido-cellobioses isomères.

A la suite de nos recherches, d'autres travaux effectués dans notre laboratoire ont montré que des α-galactosidases de sources variées pourraient avoir des spécificités différentes, tant hydrolysantes que transférantes.

Avec TO DONG, nous avons réussi à isoler, par une méthode de chromatographie sur colonne d'alumine, deux α-galactosidases des graines de Café. Ces enzymes transferent toutes deux le radical α-galactopyranosyl sur le saccharose pour donner du raffinose; elles se différencient l'une de l'autre par leur pH optimum et par leur Km. De plus, nous avons montré que les α-galactosidases des graines de Plantago psyllium et de Plantago ovata ont des propriétés transférantes qui diffèrent de celles des enzymes du Café ou de la Luzerne. Nous avons pu isoler deux α-galactosidases distinctes dans les graines de Plantago ovata : l'une transfère sur le saccharose pour donner du plantéose, tandis que l'autre conduit au raffinose (100).

La diversité des réactions de transgalactosylation peut être expliquée par l'existence d'une certaine corrélation entre l'action des α-galactosidases de sources variées et par la présence, dans les végétaux supérieurs, de nombreux galactosides du saccharose.

-o-o-o-

BIBLIOGRAPHIE

1. AHMED (Z.F.) et WHISTLER (R.L.)

   J. Amer. Chem. Soc., I950, 72, 2554

2. ANAGNOSTOPOULOS (C.), COURTOIS (J.E.) et PETEK (F.)

   Bull. Soc. Chim. Biol., I954, 36, 1115

3. ANDREWS (P.), HOUGH (L.) et JONES (J.K.N.)

   J. Amer. Chem. Soc., I952, 74, 4029

4. ARNAUD (M.)

   Th. Doc. Etat Pharm., Paris, I958

5. ASSELINEAU (J.)

   Bull. Soc. Chim. France, I955, 937

6. BACON (J.S.D.)

   The oligosaccharides.

   Bull. Soc. Chim. Biol., I960, 42, I44I-I449

7. BARKER (S.A.) et BOURNE (E.J.)

   Quart. Rev. Chem., I953, 7, 56

8. BAU (A.)

   Chem. Ztg., I895, I9, I873

9. BAU (A.)

   Chem. Ztg., I902, 26, 69

10. BEAN (R.C.) et HASSID (W.Z.)

    J. Biol. Chem., I955, 2I2, 4II

11. BIERRY (H.)

    C.R. Acad. Sc., I9I3, I56, 265

12. BLAGOVESCHENSKI (A.V.)

Biochem. J., I930, 24, I337

13. BLANCHARD (P.H.) et ALBON (N.)

Arch. Biochem., I950, 29, 220

14. BOURNE (E.J.)

Biochem. Soc. Symp., I953, 11, 3

15. BOURQUELOT (E.)

J. Pharm. Chim., I9I4, 10, 393

16. BOURQUELOT (E.) et HÉRISSEY (H.)

J. Pharm. Chim., I900, (6ème série), 11, 104

17. BOURQUELOT (E.) et HÉRISSEY (H.)

Journ. Pharm. Chim., I900, (6ème série), 11, 357

18. BOURQUELOT (E.) et HÉRISSEY (H.)

Journ. Pharm. Chim., I900, (6ème série), 11, 589

19. CALAMARI (J.)

Th. M.S. Iowa State College, I953

20. CARRÈRE (C.), LAIBIN (S.) et COURTOIS (J.E.)

Ann. Pharm. Franç., I96I, I9, I6I

2I. CHARLSON (A.J.) et PERLIN (A.S.)

Canad. J. Chem., I956, 34, I200

22. CONCHIE(J.) et LEVY (G.A.)

Biochem. J., I957, 65, 389

23. CONCHIE (J.) et MANN (T.)

Nature, I957, I79, II90

24. CONSDEN (R.), GORDON (A.H.) et MARTIN (A.J.P.)

Biochem. J., I944, 38, 224

25. CORDEBARD (H.)

Jl. Pharm. Chim., I939 (8), 30, 263

26. COURTOIS (J.E.), ANAGNOSTOPOULOS (C.) et PETEK (F.)

Bull. Soc. Chim. Biol., I953, 35, 73I

27. COURTOIS (J.E.), ANAGNOSTOPOULOS (C.) et PETEK (F.)

Enzymologia, I954, I7, 69

28. COURTOIS (J.E.), ANAGNOSTOPOULOS (C.) et PETEK (F.)

Bull. Soc. Chim. Biol., I958, 40, I277

29. COURTOIS (J.E.), CARRÈRE (C.) et PETEK (F.)

Bull. Soc. Chim. Biol., I959, 4I, I25I

30. COURTOIS (J.E.), CHARARAS (C.) et DEBRIS (M.M.)

Bull. Soc. Chim. Biol., I96I, 43, II73

3I. COURTOIS (J.E.) et LECLERC (M.)

Bull. Soc. Chim. Biol., I956, 38, 365-375

32. COURTOIS (J.E.) et LE DIZET (P.)

Bull. Soc. Chim. Biol., I955, 37, 387

33. COURTOIS (J.E.) et PERCHERON (F.)

Bull. Soc. Chim. Biol., I96I, 43, I67

34. COURTOIS (J.E.) et PETEK (F.)

Recherches non publiées

35. COURTOIS (J.E.) et PETEK (F.)

Bull. Soc. Chim. Biol., I957, 39, 7I5

36. COURTOIS (J.E.), PETEK (F.) et TO DONG

Bull. Soc. Chim. Biol., I962, 44, 11

37. COURTOIS (J.E.), PETEK (F.) et ZANOUZI (M.A.K.)

C.R. Soc. Biol., I962, I56, 565

38. COURTOIS (J.E.), PETEK (F.) et ZANOUZI (M.A.K.)

Bull. Soc. Chim. Biol., I962, 44 (à l'impression)

39. COURTOIS (J.E.) et RAMET (M.)

Bull. Soc. Chim. Biol., I947, 29, 240

40. COURTOIS (J.E.) et WICKSTRÖM (A.)

Bull. Soc. Chim. Biol., I950, 32, 759

41. COURTOIS (J.E.), WICKSTRÖM (A.) et LE DIZET (P.)

Bull. Soc. Chim. France, I952, I9, I006

42. COURTOIS (J.E.), WICKSTRÖM (A.) et LE DIZET (P.)

Bull. Soc. Chim. Biol., I956, 38, 85I

43. COURTOIS (J.E.), WICKSTRÖM (A.) et LE DIZET (P.)

Bull. Soc. Chim. Biol., I952, 34, II2I et I953, 35, 1111

44. DEBRIS (M.M.), COURTOIS (J.E.) et PETEK (F.)

Bull. Soc. Chim. Biol., I962, 44, 29I

45. DEDONDER (R.A.)

Glycosidases and transglycosidation.

Ann. Rev. Biochem., I96I, 30, 347-382.

46. EDELMAN (J.)

Transfructosidation in plants, and especially in Helianthus tuberosus L.

Bull. Soc. Chim. Biol., I96I, 42, I762

47. EVANS (W.A.L.)

Exptl Parasitol., I956, 5, I9I

48. FISCHER (E.) et LINDNER (P.)

Ber., I895, 28, 3034

49. FLEURY (P.) et BOUTOT (L.)

J. Pharm. Chim., I922, 26, 209

50. FLEURY (P.), COURTOIS (J.E.) et BIEDER (A.)

Bull. Soc. Chim. France, I952, I9, II8

5I. FLEURY (P.), COURTOIS (J.E.) et BIEDER (A.)

Ann. Pharm. Franç., I953, 11, 249

52. FRENCH (D.)

Adv. Carb. Chem., I954, 9, I49

53. FRENCH (D.)

J. Amer. Chem. Soc., I955, 77, I024

54. FRENCH (D.), WILD (G.M.) et JAMES (W.J.)

J. Amer. Chem. Soc., I953, 75, 3664

55. FRENCH (D.), WILD (G.M.), YOUNG (B.) et JAMES (W.J.)

J. Amer. Chem. Soc., I953, 75, 709

56. HATORI (S.) et SHIROYA(T.)

Arch. Biochem. Biophys., I95I, 34, I2I

57. HELFERICH (G.)

Ber. verhandl. sächs. Akad. wiss. Leipzig, Math.phys.klass,

I943, 95, I35

58. HELFERICH (B.) et VORSATZ (E.)

Z. physiol. Chem., I935, 237-254

59. HELFERICH (B.), DEMANT (S.), GOERDELER (J.) et BOSSE (R.)

Z. Physiol. Chem., I948, 283, I79

60. HELFERICH (B.) et SCHMITZ-HILLEBRECHT (E.)

Ber. Dtsch. Chem. Gesell., I933, 66, 378

61. HENDERSON (M.E.), HOUGH (L.) et PAINTER (T.J.)

J. Chem. Soc., octobre I958, 35I9

62. HERISSEY (H.) et AUBRY (A.)

J. Pharm. Chim. I9I4, 9, 225

63. HÉRISSEY (H.) et AUBRY (A.)

J. Pharm. Chim., I9I4, 2, 327

64. HÉRISSEY (H.), FLEURY (P.), WICKSTRÖM (A.), COURTOIS (J.E.) et LE DIZET(P

Bull. Soc. Chim. Biol., I954, 36, I507

65. HÉRISSEY (H.), WICKSTRÖM (A.) et COURTOIS (J.E.)

Bull. Soc. Chim. Biol., I95I, 33, 642 et I952, 34, 856

66. HILL (K.)

Ber. verhandl., Sächs. Akad. Wiss. Leipzig, Math.phys. Klass,

I934, 86, II5

67. HIRST (E.L.), JONES (J.K.N.) et WALDER (W.O.)

J. Chem. Soc., I947, I443

68. HOECHNER (E.)

Z. Hyg. infectionskrankh., I949, I29, 5I9

69. HOFMANN (E.)

Biochem. Z., I934, 273, I98

70. HOFMANN (E.)

Biochem. Z., I934, 272, I33

71. HOGNESS (D.S.) et BATTLEY (E.H.)

Feder. proc., I957, I6, I97

72. HOUGH (L.), JONES (J.K.) et WADMAN (W.H.)

J. Chem. Soc., I949, 25II

73. HOUGH (L.), JONES (J.K.N.) et RICHARDS (E.L.)

J. Chem. Soc., I954, 295

74. HUDSON (C.S.) et HARDINGS (T.S.)

J. Amer. Chem. Soc., I9I5, 37, 2734

75. KOIKE (H.)

Zool. Mag. Tokyo, I954, 63, 228

76. KOPPEL (J.L.), PORTER (C.J.) et CROCKER (B.F.)

J. gen. Physiol., I953, 36, 703

77. LAIDLAW (R.A.) et REID (S.G.)

Nature, I950, I66, 476

78. LAIDLAW (R.A.) et WYLAM (C.B.)

J. Chem. Soc., I953, 567

79. LESTER (C.) et BONNER (D.M.)

J. Bact., I957, 73, 544

80. LEW (B.W.) et GORTNER (R.A.)

Arch. Biochem., I943, 1, 325

81. LOISEAU (D.)

Z. Ver. D. Zuckerind, I903, 40, I050

82. NAGAOKA (T.)

Tohoku J. Exptl. Med., I949, 5I, I37

83. NELSON (N.)

J. Biol. Chem., I944, I53, 375

84. NEUBERG (C.)

Biochem. Z., I907, 3, 528

85. NEUBERG (C.) et LACHMANN (S.)

Biochem. Z., I9I0, 24, I7I

86. NEWCOMER (W.S.)

Physiol. Zool., I956, 29, I57

87. PERLIN (A.S.)

Anal. Chem., I955, 27, 296

88. PETEK (F.) et TO DONG

Recherches non publiées

89. POLONSKY (J.), FERREOL (G.), TOUBIANA (R.) et LEDERER (E.)

Bull. Soc. Chim. France, I956, I47I

90. POSTIC (F.), COURTOIS (J.E.) et RABATÉ (J.)

J. Pharm. et Chim., I940 (9), 1, 526

9I. REIDHAM (J.B.)

Biochem. J., I960, 76, I3

92. RABATÉ (J.)

Bull. Soc. Chim. Biol., I935, I7, 572

93. RABATÉ (J.)

Bull. Soc. Chim. Biol., I938, 20, 449

94. RABATÉ (J.)

Heteroglykosidases in BAMANN (E.) et MYRBÄCK (K.)

Methodik der Fermentforschung, I94I, 2, I8I8

95. SAROJA (K.), VENKATARAMAN (L.) et GIRI (K.V.)

Biochem. J., I955, 60, 399

96. SHEININ (R.) et CROCKER (D.F.)

3ème Cong. intern. Biochim., Bruxelles, I955, Rés. Communic. p. 9I

97. SOMOGYI (M.)

J. Biol. Chem., I945, I60, 69

98. SUGIHARA (J.M.)

Adv. Carbohydr. Chem., I953, 8, 1

99. SUMNER (J.B.) et SOMERS (J.B.)

Laboratory experiments in Biological Chemistry,

Academic press, New York, I949, p. I32

I00. TO DO

Th. Doct. Etat pharm., Paris, I962

I0I. VEIBEL (S.)

in BAMANN (E.) et MYRBÄCK (K.) Die Methoden der Fermentforschung G. Thieme verlag, Leipzig, I94I, vol. 2, p. I787

I02. VEIBEL (S.)

Hydrolysis of Galactosides, Mannosides, and Thioglycosides, in SUMNER (J.B.) et MYRBÄCK (K.) The enzymes, lrst Edt. Academic press, New York, I950, vol. l, part l, p. 62I-634

I03. WADMAN (W.H.), ANDERSON (A.B.) et HASSID (W.Z.)

J. Amer. Chem. Soc., I954, 76, 4097

I04. WALLENFELS (K.)

in Biologie und Wirkung der Fermente Berlin Springer, I953

I05. WATTIEZ (N.) et HANS (M.)

Bull. Acad. Méd. Belg., I943, 8, 386

I06. WEBBER (L.G.)

Australian J. Zool., I957, 5, I64

I07. WEIDENHAGEN (R.)

Z. ver. Deut. Zucker-ind., I927, 77, 696

I08. WEIDENHAGEN (R.)

Z. ver. Deut. Zucker-ind., I928, 78, 99

I09. WEIDENHAGEN (R.) et RENNER (A.)

Z. wirtschaftsgruppe Zuckerind, I936, 86, 22

II0. WILLIAMS (R.J.) and KIRBY (H.)

Science, I948, I07, 48I

lll. WHISTLER (R.L.) et DURSO (D.F.)

J. Amer. Chem. Soc., I950, 72, 677

II2. WHISTLER (R.L.) et DURSO (D.F.)

J. Amer. Chem. Soc., I95I, 73, 4I89

II3. WHISTLER (R.L.) et DURSO (D.F.)

J. Amer. Chem. Soc., I952, 74, 5I40

II4. WHISTLER (R.L.), EOFF (W.H.) et DOTY (D.M.)

J. Amer. Chem. Soc., I950, 72, 4938

II5. WHISTLER (R.L.) et SMART (C.L.)

Polysaccharide Chemistry, Academic press, New York, I953

II6. WHISTLER (R.L.) et STEIN (J.Z.)

J. Amer. Chem. Soc., I95I, 73, 4I87

II7. ZANOUZI (M.A.K.)

Th. Doct. Univ. Pharm., Paris, I962

-o-o-o-

TABLE DES MATIERES

Pages

INTRODUCTION. 1

PREMIERE PARTIE : GENERALITES

Chapître I : Généralités sur les α-galactosidases 5

I. Répartition 5

II. Spécificité et propriétés 8

Chapître II : Matériel et techniques I3

I. Préparation des substrats I3

1) Préparation du mélibiose I3

2) Préparation du stachyose I5

3) Préparation du phényl-α-D-galactoside I5

4) Préparation de la galactomannane I6

II. Préparation des enzymes I7

1) Préparation de l'émulsine du Café I7

2) Préparation de l'α-galactosidase de *Penicillium paxillus* I7

III. Techniques analytiques I7

1) Chromatographie sur papier I7

2) Dosage des hexoses I9

3) Dosage du méthanol combiné I9

DEUXIEME PARTIE : ACTIVITES HYDROLYSANTES DES α-GALACTOSIDASES

Chapître I : Hydrolyse des galactosides du saccharose 22

I. Action de l'α-galactosidase sur le stachyose 22

Introduction

1) Etude, en fonction du temps, de l'action de l'α-galactosidase sur le stachyose 23

2) Isolement du saccharose 25

3) Isolement du raffinose 26

Conclusion 29

Pages

II. Action de l'α-galactosidase sur divers galactosides du saccharose et du glucose 29

Chapître II : Hydrolyse de la galactomannane 30

I. Action de l'α-galactosidase du Café 30

Introduction 30

Partie expérimentale 31

Conclusion 33

II. Action de la taka-diastase 34

Introduction 34

Partie expérimentale 37

1) Matériel et technique 37

2) Etude de l'évolution de l'hydrolyse 37

3) Isolement du disaccharide 38

4) Identification du disaccharide 39

Conclusion 42

III. Action de l'α-galactosidase de Penicillium paxillus 42

TROISIEME PARTIE : ACTIVITES TRANSFERANTES DES α-GALACTOSIDASES.

Chapître I : Obtention de méthyl-α-D-galactoside 44

Introduction 44

Partie expérimentale 45

1) Essai de transfert avec le mélibiose comme donateur 45

2) Identification de l'α-méthyl-D-galactoside 47

3) Action synthétisante et action transférante sur le méthanol de l'α-galactosidase 49

Conclusion 50

Chapître II : Obtention du raffinose 52

Introduction 52

Partie expérimentale 53

Pages

A. Donateur 53

B. Accepteurs 53

C. Enzymes 53

D. Protocole des essais 53

E. Identification par chromatographie des corps formés 54

Résultats 55

Discussion 60

Chapître III : Obtention d'épimélibiose

Introduction 64

Partie expérimentale 65

1) Réaction de transfert 65

2) Fractionnement des produits de la réaction 65

3) Propriétés physiques 67

4) Propriétés chimiques 68

Conclusion 74

Résumé et conclusions générales 75

Bibliographie 79

Table des matières 89

-o-o-o-